

**Struktur- und Funktionsanalyse
von Pathogenitätsfaktoren aus
Listeria monocytogenes und
*Staphylococcus aureus***

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

**von Marina Eiting
aus Friesoythe**

1. Referent:	Prof. Dr. Dirk W. Heinz
2. Referent:	Prof. Dr. Dieter Jahn
eingereicht am:	02.06.2005
mündliche Prüfung (Disputation) am:	26.08.2005

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. Dr. Dirk Heinz, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

M. Eiting, G. Hagelüken, W.-D. Schubert and D. W. Heinz (2005): **The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif.**
Mol Microbiol Vol. 56: 433-446

Tagungsbeiträge

- M. Eiting, G. Hagelüken, W.-D. Schubert, D. Heinz (2004): **The mechanism of activation of PrfA, the sole regulator of pathogenicity in *Listeria monocytogenes*.** (Vortrag)
7th Heart of Europe Bio-Crystallography Meeting, Breslau, Polen
- G. Hagelüken, M. Eiting, W.-D. Schubert, D. Heinz (2004): **Crystal structure of PrfA_{G145S}, a constitutively active mutant of PrfA, the key regulator of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*.** (Poster)
International conference at EMBL (DESY), Hamburg
- M. Lindemann, F. Hofmann, W.-D. Schubert, I. Just and D. Heinz (2004): **Crystal structure of C3stau2, a new C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus*.** (Poster)
Gemeinsame Jahrestagung DGK + DGKK, Jena
- M. Lindemann, F. Hofmann, W.-D. Schubert, I. Just and D. Heinz (2003): **Crystal structure of C3stau2, a novel C3-like ADP-ribosyl transferase from *Staphylococcus aureus*.** (Vortrag)
6th Heart of Europe Bio-Crystallography Meeting, Wittenberg
- M. Lindemann, W.-D. Schubert, D. Heinz (2002): **Crystallization and preliminary X-ray studies of PrfA from *Listeria monocytogenes*.** (Vortrag)
5th Heart of Europe Bio-Crystallography Meeting, Goslar

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **II**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **5**

1 EINLEITUNG **6**

1.1	Infektionskrankheiten als aktuelles und weltweites Problem	6
1.2	<i>Listeria monocytogenes</i> - Mikrobiologie und Pathogenese	6
1.2.1	Infektionsprozess von <i>L. monocytogenes</i>	8
1.3	PrfA - der Hauptvirulenzregulator in <i>L. monocytogenes</i>	9
1.3.1	PrfA ist ein Mitglied der Crp/Fnr-Familie	11
1.3.2	Regulation der PrfA-Synthese und Aktivität	13
1.3.3	Regulation der Virulenzgenexpression durch PrfA	14
1.4	Die hyperhämolytische PrfA - Variante PrfA _{G145S}	15
1.5	Ziel des Teilprojektes PrfA	16
1.6	<i>Staphylococcus aureus</i> - Mikrobiologie und Pathogenese	17
1.7	C3-Exoenzyme aus <i>S. aureus</i>	19
1.7.1	C3stau1-3 sind Mitglieder der C3-ähnlichen ADP-RT-Familie	20
1.7.2	ADP-Ribosylierung als wichtiger Schritt für pathogene Mechanismen	22
1.7.3	Rho GTPasen als Substrate für C3-ähnliche ADP-RT	24
1.8	C3stau2 - eine besondere ADP-RT?	27
1.9	Ziel des Teilprojektes C3stau2	28

2 ERGEBNISSE **29**

2.1	Strukturanalyse von PrfA	29
2.1.1	Produktion und Reinigung von PrfA	29
2.1.2	Kristallisation	33
2.1.3	Datensammlung und Prozessierung	34
2.1.4	Strukturlösung von PrfA durch Molekularen Ersatz	35
2.1.5	Verfeinerung und Qualität der Daten	36
2.1.6	Die Tertiärstruktur von PrfA	38
2.1.7	Strukturlösung der PrfA _{G145S} -Mutante	40
2.1.8	Strukturelle Unterschiede zwischen PrfA _{wt} und PrfA _{G145S}	40
2.1.9	Wie induziert die Mutation die strukturellen Veränderungen im HTH-Motiv?	44
2.2	PrfA-DNA-Interaktionsstudien	47
2.2.1	Untersuchung der PrfA-DNA-Interaktion mittels EMSA	47
2.2.2	Untersuchung der PrfA-DNA-Interaktion mittels Gelfiltration	49
2.2.3	Untersuchung der PrfA-DNA-Interaktion mittels SPR	50
2.2.4	Kokristallisation von PrfA mit Oligonukleotiden	53
2.3	Strukturanalyse von C3stau2	61
2.3.1	Kristallisation von C3stau2	61
2.3.2	Datensammlung und Prozessierung	62
2.3.3	Strukturlösung von C3stau2 durch Molekularen Ersatz	63
2.3.4	Verfeinerung und Qualität der Daten	63

Inhaltsverzeichnis

2.3.5	Die Tertiärstruktur von C3stau2	64
2.3.6	Strukturvergleich von C3stau2 mit C3bot1	67
2.4	C3stau2-RhoA-Interaktionsstudien	71
2.4.1	Produktion und Reinigung von RhoA	71
2.4.2	Untersuchung der C3stau2-RhoA -Interaktion mittels Gelfiltration	74
2.4.3	Untersuchung der C3stau2-RhoA-Interaktion mittels SPR	75
2.4.4	Kristallisation des C3stau2-RhoA-Komplexes	76
3	DISKUSSION	78
3.1	PrfA ist strukturell verwandt mit Cap und CoxA	78
3.2	Möglicher Aktivierungsmechanismus von PrfA	80
3.3	Benötigt PrfA einen Kofaktor?	82
3.4	Untersuchungen der PrfA-DNA-Interaktion	85
3.4.1	Analyse der DNA-Bindung von rekombinantem PrfA	85
3.4.2	Bestimmung der DNA-Bindungskonstante von PrfA	86
3.4.3	PrfA-DNA-Kristallisation	87
3.5	Substratspezifität von C3stau2	89
3.5.1	Die ARTT-Schleife als Substraterkennungsmotiv?	89
3.5.2	Andere Substraterkennungsmotive in C3stau2?	93
3.6	C3stau2-RhoA-Interaktion	96
4	ZUSAMMENFASSUNG	97
4.1	PrfA aus <i>L. monocytogenes</i>	97
4.2	C3stau2 aus <i>S. aureus</i>	98
5	MATERIAL UND METHODEN	99
5.1	Material	99
5.1.1	Herstellerfirmen der verwendeten Chemikalien	99
5.1.2	Bakterienstämme	99
5.1.3	Plasmide	99
5.1.4	Oligonukleotide	100
5.1.5	Antikörper	102
5.2	Puffer und Medien	102
5.2.1	Proteinbiochemische Pufferlösungen	102
5.2.2	Molekularbiologische Pufferlösungen	103
5.2.3	Medien für Bakterien	103
5.3	Molekularbiologische Methoden	104
5.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	104
5.3.2	Ortsspezifische Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i>)	104
5.3.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	104
5.3.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	105
5.3.5	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	105
5.3.6	Ligation	105
5.3.7	DNA-Sequenzierung	105
5.3.8	Agarosegelelektrophorese	105
5.3.9	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	106

Inhaltsverzeichnis

5.3.10	Transformation von Plasmid-DNA in CaCl ₂ -kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	106
5.3.11	Reinigung von Oligonukleotiden für die Kristallisation	106
5.3.12	Entsalzung und Ankonzentrierung von Oligonukleotiden	107
5.3.13	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden	107
5.3.14	Hybridisierung von Oligonukleotiden	107
5.3.15	EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>)	108
5.4	Mikrobiologische Methoden	108
5.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	108
5.4.2	Stammhaltung von <i>E. coli</i>	109
5.5	Biochemische Methoden	109
5.5.1	Proteinproduktion und Herstellung von <i>E. coli</i> -Zellextrakten	109
5.5.2	Chromatographische Trennmethoden	110
5.5.2.1	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose	110
5.5.2.2	Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose (GS)	110
5.5.2.3	Ionenaustauschchromatographie (IEC)	111
5.5.2.4	Gelpermeationschromatographie	111
5.5.3	Dialyse	112
5.5.4	Konzentrierung von Proteinen	112
5.5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	112
5.5.6	Proteintransfer auf Membranen (Western Blot)	112
5.5.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen	113
5.5.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	113
5.5.9	N-terminale Sequenzierung	114
5.5.10	Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinproben	114
5.5.11	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	114
5.5.12	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR)	115
5.6	Röntgenkristallographische Methoden	116
5.6.1	Kristallisation von Proteinen	117
5.6.2	Kristallisation von Protein-DNA- bzw. Protein-Protein-Komplexen	117
5.6.3	Kristallographische Datenerfassung	118
5.6.4	Datenprozessierung	119
5.6.5	Bestimmung des Matthews-Koeffizienten	120
5.6.6	Strukturlösung mittels Molekularem Ersatz	120
5.6.7	Modellbau und -verfeinerung	121
5.6.8	Analyse von Strukturmodellen	122
5.6.9	Erstellen von Abbildungen	122
5.6.10	Strukturvergleich	123
LITERATURVERZEICHNIS		124
DANKSAGUNG		136

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge	K_D	Dissoziationskonstante
ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge von 280 nm	LB	Luria-Bertani
A_{280nm}	Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm	M	Molekulargewichtsstandard
Å	Angström	MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	Mr	relatives Molekulargewicht
ADP-RT	ADP-Ribosyltransferase	N-	Amino-
ARTT	<i>ADP-ribosylating turn turn</i>	NAD	oxidierte Form des Nikotinamid-Adenin-Dinukleotids (NAD^+)
AS	Aminosäure	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
bp	Basenpaare	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C-	Carboxy-	PBS	Posphatpuffer (<i>phosphate buffer saline</i>)
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat	PDB	Proteindatenbank
CCD	<i>charged-coupled device</i>	PEG	Polyethylenglycol
Ci/mmol	Curie pro Millimol	pmol	Pikomol
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat	PN	Phosphat-Nikotinamid
DTT	Dithiothreitol	PrfA	positiver Transkriptionsfaktor A
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat	RU	Resonanzeinheiten
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
g	relative Zentrifugalkraft	SPR	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie
GDP	Guanosin-5'-diphosphat	TAD	β -Methylen-thiazol-4-carboxamid Adenindinukleotid
GS	Glutathion-Sepharose	U/min	Umdrehungen pro Minute
GST	Glutathion-S-Transferase	V_E	Elutionsvolumen
GTP	Guanosin-5'-triphosphat	VIP2	<i>vegetative insecticidal protein</i>
His ₆	sechs konsekutive Histidin-Reste	V_m	Matthews-Koeffizient
HTH	Helix-Turn-Helix	v/v	Volumenanteil
IEC	Ionenaustauschchromatographie	w/v	Gewichtsanteil
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	WT	Wildtyp
KAC	Kationenaustauschchromatographie		
kb	Kilobasen		

1 Einleitung

1.1 *Infektionskrankheiten als aktuelles und weltweites Problem*

In einem Bericht des Jahres 1997 führte die Weltgesundheitsorganisation WHO ca. 33 % der insgesamt 52 Millionen Todesfälle des Vorjahres auf Infektionskrankheiten zurück, die weltweit in der Todesursachenstatistik noch vor den Herz-Kreislauf- und Tumorerkrankungen liegen.

Die Entdeckung und Entwicklung wirksamer Antibiotika und Impfstrategien hat in den vergangenen Jahrzehnten überwältigende Erfolge bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten erzielt. Eine der Hauptursachen für das vermehrte Auftreten von bakteriellen Infektionskrankheiten heutzutage ist jedoch die zunehmende Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika. Vor allem in den Industrieländern werden Antibiotika häufig zu leichtfertig verwendet, so dass sich schnell multi-resistente Stämme entwickeln können. Die gestiegene weltweite Mobilität hat zudem eine Ausbreitung von Krankheiten in Regionen zur Folge, in denen die entsprechenden Erreger bisher unbekannt waren. Dies wird vor allem durch die globale Ausbreitung der Immunschwäche AIDS, der Lungenkrankheit SARS und der Tuberkulose deutlich.

Da die Therapie und Prävention von Infektionskrankheiten ein grundlegendes Verständnis der Mechanismen von Infektionsprozessen voraussetzt, ist die Erforschung der komplexen Interaktionen zwischen dem Infektionserreger und dem Wirt von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Pathogenitätsfaktoren zweier humanpathogener Bakterien -*Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus*- funktionell und strukturell im Detail untersucht werden, die einen entscheidenden Einfluss auf den Infektionsprozess im Menschen nehmen.

1.2 *Listeria monocytogenes - Mikrobiologie und Pathogenese*

Die Gattung *Listeria* gehört zu den Gram-positiven, nicht-sporenbildenden, fakultativ intrazellulären Stäbchenbakterien (Abb. 1). Sie besiedeln Böden, Gewässer und Pflanzen. Aber auch Tierprodukte können durch Listerien kontaminiert sein. Sie vermehren sich nicht nur bei niedrigen Temperaturen knapp über dem Gefrierpunkt und bei hohen Salzkonzentrationen (bis zu

40 %), sondern auch über einen großen pH-Bereich (pH 4.4 – 9.4) und bei reduziertem Sauerstoffangebot (wie z. B. in Vakuumverpackungen) (Junttila *et al.*, 1988; Farber & Peterkin, 1991). Da diese Bedingungen für die Lagerung und Konservierung von Nahrungs- und Futtermitteln verwendet werden, können die Listerien leicht in den menschlichen Körper gelangen.

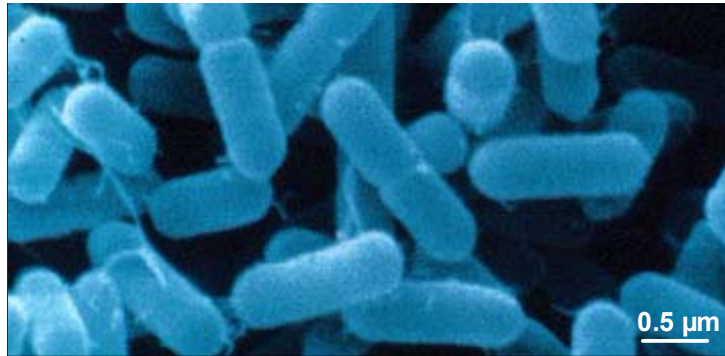


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *L. monocytogenes*.
Übernommen aus <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>

Von den sechs beschriebenen Arten der Gattung *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii*) sind lediglich zwei, *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*, opportunistische Krankheitserreger (Seeliger, 1984; Rocourt, 1988). Dabei ist *L. ivanovii* ausschließlich tierpathogen, während *L. monocytogenes* auch Menschen infizieren kann. Vornehmlich immungeschwächte Individuen, schwangere Frauen, Neugeborene, alte Menschen sowie Patienten mit chronischen Erkrankungen sind durch *L. monocytogenes* gefährdet (Gellin & Broome, 1989; Lorber, 1997). Nach dem Verzehr kontaminierter Nahrung wird der Großteil der Bakterien durch das saure Milieu des Magens abgetötet. Die Listerien, denen es gelingt, den Darm zu erreichen, erzwingen mittels Invasinen die eigene Aufnahme in Epithelzellen. Von dort gelangen sie über die Blutbahn oder die Lymphwege (möglicherweise im Inneren der Makrophagen) zur Leber, Milz und anderen Organen und können durch Überwindung der Blut-Hirn- oder der Plazentaschranke auch Hirn(haut)entzündungen verursachen oder ungeborene Kinder infizieren und zu Fehlgeburten führen (Gellin & Broome, 1989; Schlech, 2000). Für Personen mit intaktem Immunsystem stellen Listerien im Allgemeinen demgegenüber keine Bedrohung dar, da ausreichend Neutrophile und Makrophagen die Erreger phagozytieren und enzymatisch abbauen, und die Infektion in der Leber überwunden wird. Trotz häufiger Kontakte der Bevölkerung mit *L. monocytogenes* tritt das Krankheitsbild Listeriose

erstaunlich selten auf. Bricht sie jedoch aus, ist die Sterblichkeitsrate sehr hoch (20-30 %) (Skogberg *et al.*, 1992).

1.2.1 Infektionsprozess von *L. monocytogenes*

L. monocytogenes durchläuft auf zellulärer Ebene einen charakteristischen Infektionszyklus, der durch eine Vielzahl molekularer Interaktionen zwischen bakteriellen Virulenzfaktoren und Komponenten der Wirtszelle gekennzeichnet ist. Auf zellulärer Ebene wurde dieser Zyklus im Darmepithel erstmals von Tilney & Portnoy (1989) beschrieben (Abbildung 2). Nach der Aufnahme kontaminierter Nahrungsmittel beginnt die Infektion des Wirtsorganismus mit der Aufnahme von *L. monocytogenes* durch die Darmepithelzellen. Dabei induziert das Bakterium nach Anheftung an die Plasmamembran mittels Invasinen die Bildung von Membranausstülpungen, die das Bakterium vollständig umschließen (Abb. 2, Schritt A). Dieser erste Invasions-schritt wird abhängig vom Zelltyp durch die listeriellen Oberflächenproteine Internalin (InlA, bei Darmepithelzellen) und InlB (bei den meisten anderen Zelltypen) vermittelt (Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1995; Lingnau *et al.*, 1995).

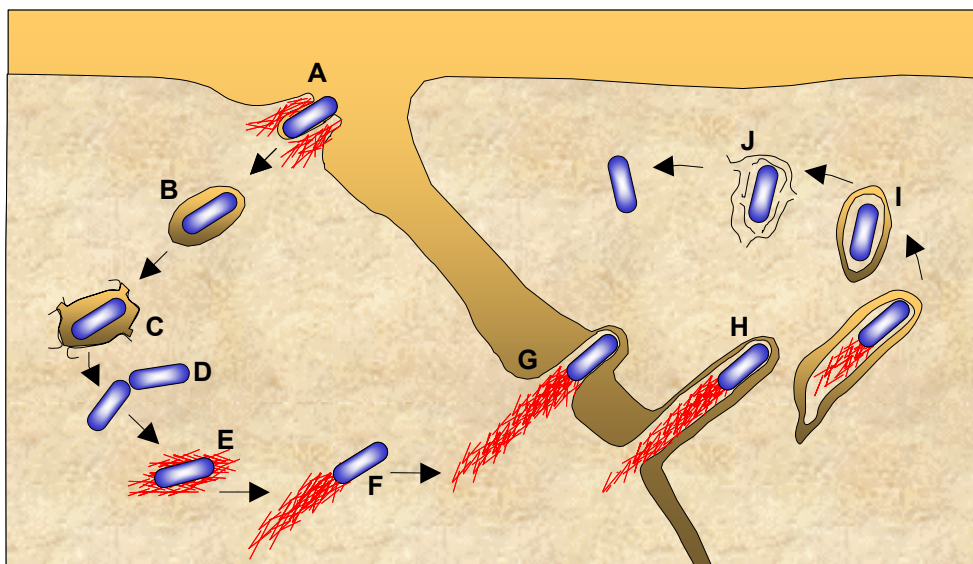


Abbildung 2: Schematische Darstellung des intrazellulären Infektionszyklus von *L. monocytogenes*.

Schematische Darstellung des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* (blau) innerhalb zweier benachbarter Darmepithelzellen. Aktinfilamente sind rot dargestellt. Die Erklärungen zu den Schritten A bis J befinden sich im Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Tilney & Portnoy (1989).

Nach erfolgter Phagozytose befindet sich *L. monocytogenes* im Zytoplasma der Wirtszelle innerhalb einer primären Vakuole (Schritt B), die durch Ver-

schmelzung mit Lysosomen zu einem Phagolysosom heranreift. Normalerweise zerstören diese Phagolysosomen eindringende Bakterien mit hoher Effizienz durch Absenkung des pH-Wertes und Anreicherung reaktiver Sauerstoffmetabolite. *L. monocytogenes* befreit sich jedoch rechtzeitig, indem es die umgebende Membran durch Sekretion des porenbildenden Zytolysins Listeriolysin O (LLO) und der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) lysiert (Geoffroy *et al.*, 1987; Leimeister-Wächter *et al.*, 1991; Camilli *et al.*, 1993) (Schritt C). LLO ist einer der dominanten Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*. Mutanten mit einem Defekt im kodierenden *hly*-Gen sind avirulent (Gaillard *et al.*, 1986; Portnoy *et al.*, 1988).

Im Zytoplasma der Wirtszelle vermehren sich die Bakterien (Schritt D). Zudem rekrutieren sie über das Oberflächenprotein ActA, ebenfalls ein Virulenzfaktor, den Arp2/3-Komplex sowie VASP (Skoble *et al.*, 2001) und führen somit zur Neubildung von Aktinfilamenten auf ihrer Oberfläche (Schritt E) (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1999). Die Aktinfilamente werden an einem der beiden Zellpole zu einer Kometenschweif-ähnlichen Struktur organisiert, mittels derer sich das Bakterium durch das Zytoplasma der Wirtszelle bewegt (Schritt F). Beim Kontakt mit der Plasmamembran der Wirtszelle bewirken die motilen Listerien die Ausbildung von Zellfortsätzen (Pseudopodien) (Schritt G), die mit den enthaltenen Bakterien von benachbarten Zellen phagozytiert werden (Schritt H). Zunächst von einer Doppelmembran umgeben (sekundäre Vakuole) (Schritt I), befreit sich *L. monocytogenes* mit Hilfe der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase (Lecithinase) sowie dem LLO (Schritt J) (Gedde *et al.*, 2000). Ein neuer Infektionszyklus kann beginnen. Mit dieser Strategie kann sich die Infektion auf benachbarte Zellen ausbreiten, ohne die Bakterien dem extrazellulären Raum und folglich der humoralen Immunantwort des Wirts, bestehend aus zirkulierenden Antikörpern, dem Komplementsystem und neutrophilen Granulozyten, auszusetzen. Eine Abwehr der Infektion ist daher ausschließlich durch die zellvermittelte Immunantwort möglich (Finelli *et al.*, 1999; Edelson & Unanue, 2000; Cossart & Bierne, 2001).

1.3 PrfA - der Hauptvirulenzregulator in *L. monocytogenes*

Die Gene der am beschriebenen Infektionszyklus beteiligten Proteine sind auf dem bakteriellen Chromosom in kleinen Gruppen von 2 bis 4 Genen oder in größeren Mehrkomponenteneinheiten angeordnet. Die ca. 9 kb große Virulenz-

geninsel LIPI-1 (*listerial pathogenicity island-1*) wurde als erste näher charakterisiert. Sie umfasst die Gene der Virulenzfaktoren PI-PLC (*plcA*), LLO (*hly*), Metalloprotease (*mpl*), ActA (*actA*) und Lecithinase (*plcB*) (Portnoy *et al.*, 1992) (Abbildung 3). Auch das Gen des positiv-regulierenden Transkriptionsfaktors PrfA (*prfA*), der für die Expression aller Gene der Insel notwendig ist, befindet sich hier (Portnoy *et al.*, 1992; Brehm *et al.*, 1996; Kreft & Vazquez-Boland, 2001). Am 5'- bzw. am 3'- Ende der LIPI-1 schließen sich die sog. Haushaltsgene *prs* (Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase) und *ldh* (Laktatdehydrogenase) an.

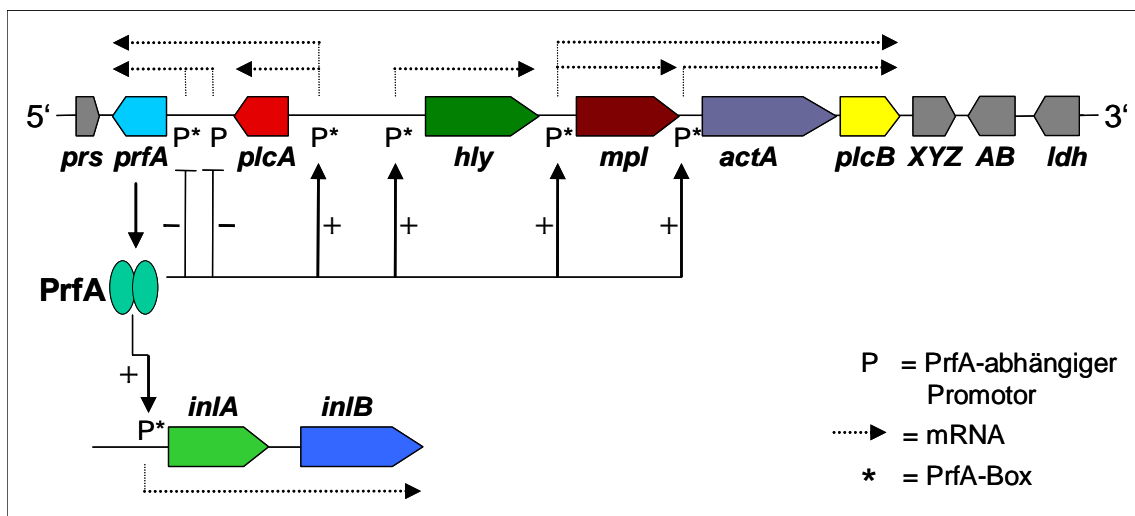


Abbildung 3: Genstruktur der LIPI-1 sowie des *inlAB*-Operons aus *L. monocytogenes*.

Anordnung einiger PrfA-regulierten Gene in LIPI-1 sowie deren Regulation durch PrfA. Mit einem (+) oder (-) beschriftete Pfeile bezeichnen transkriptionelle Induktion oder Repression durch PrfA. Die Gene kodieren folgende Proteine: *prs* - Phosphoribosyl-Pyrophosphat-Synthetase, *prfA* - positiv regulatorischer Transkriptionsfaktor A, *plcA* - Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C, *hly* - Listeriolysin O, *mpl* - eine Metalloprotease, *actA* - ActA, *plcB* - Lecithinase, *XYZ* und *AB* - offene Leseraster von unbekannter Funktion, *ldh* - Laktatdehydrogenase, *inlA* - Internalin und *inlB* - InlB. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kreft & Vazquez-Boland (2001).

PrfA ist der einzige, bisher bekannte, listerielle Transkriptionsfaktor, der direkt an der Expressionsregulation der Virulenzgene beteiligt ist. Neben den Genen der LIPI-1 unterliegen auch die Gene der Invasine InlA und InlB (Dramsi *et al.*, 1993; Lingnau *et al.*, 1995), die gemeinsam in einem Operon liegen, partiell der Kontrolle von PrfA. Ebenso werden die Gene *inlC* (InlC, Engelbrecht *et al.*, 1996; Lingnau *et al.*, 1996), *bsh* (Gallensäure-Hydrolase, Dussurget *et al.*, 2002) sowie *hpt* (Zuckerphosphat-Transporterprotein, Chico-Calero *et al.*, 2002) von PrfA positiv reguliert. Kürzlich wurde zudem durch komparative Transkriptom-analyse eine große Anzahl von Genen in *L.*

monocytogenes identifiziert, deren Expression signifikant von PrfA positiv oder negativ gesteuert wird (Milohanic *et al.*, 2003).

Das 1990 identifizierte PrfA besteht aus 237 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 27.3 kDa (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Mengaud *et al.*, 1991). Auch *L. ivanovii* und *L. seeligeri* besitzen Transkriptionsregulatoren, die eine deutliche Ähnlichkeit zu PrfA aufweisen. Ihre Aminosäuresequenz ist zu 80 % mit PrfA aus *L. monocytogenes* identisch. In *L. ivanovii* spielt PrfA eine ebenso bedeutende Rolle in der Regulation der Virulenz wie bei *L. monocytogenes*. In *L. seeligeri* dagegen werden die Virulenzfaktoren nicht exprimiert, obwohl das PrfA-Gen intakt ist. Eine mögliche Ursache könnte die Insertion des *orfE* zwischen dem *prfA*- und *plcA*-Gen sein (Karunasagar *et al.*, 1997).

PrfA ist der Hauptregulator der Virulenzgenexpression von *L. monocytogenes*. Listeria-Mutanten, die kein PrfA exprimieren können, verlieren jegliche Virulenzeigenschaften (Mengaud *et al.*, 1991; Chakraborty *et al.*, 1992; Portnoy *et al.*, 1992).

1.3.1 PrfA ist ein Mitglied der Crp/Fnr-Familie

Aminosäuresequenzvergleiche identifizieren PrfA als bakteriellen Transkriptionsregulator der Crp/Fnr-Familie. Mit dem Hauptrepräsentanten dieser Familie, dem zyklischen AMP-Rezeptorprotein (Crp, auch als Cap für *catabolite activator protein* bezeichnet) teilt PrfA eine Aminosäureidentität von 20 %. Es handelt sich bei dieser Familie durchgehend um DNA-bindende Proteine mit einer N-terminalen Nukleotid-Bindungsdomäne und einem C-terminalen Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH-Motiv) für die DNA-Bindung. Die Aktivität der Crp/Fnr-Familie wird entweder über die Bindung allosterischer Effektormoleküle wie cAMP reguliert oder über Signale wie Kohlenmonoxid, die mit einer prosthetischen Gruppe, z. B. einer Häm-Gruppe, interagieren (Körner *et al.*, 2003). Zu Beginn dieser Arbeit lagen die Kristallstrukturen zweier Gram-negativer Vertreter dieser Familie vor: von Cap, dem Prototyp dieser Familie aus *E. coli* (Weber & Steitz, 1987), und von CooA, einem CO-sensitiven Transkriptionsfaktor aus *Rhodospirillum rubrum* (Lanzilotta *et al.*, 2000).

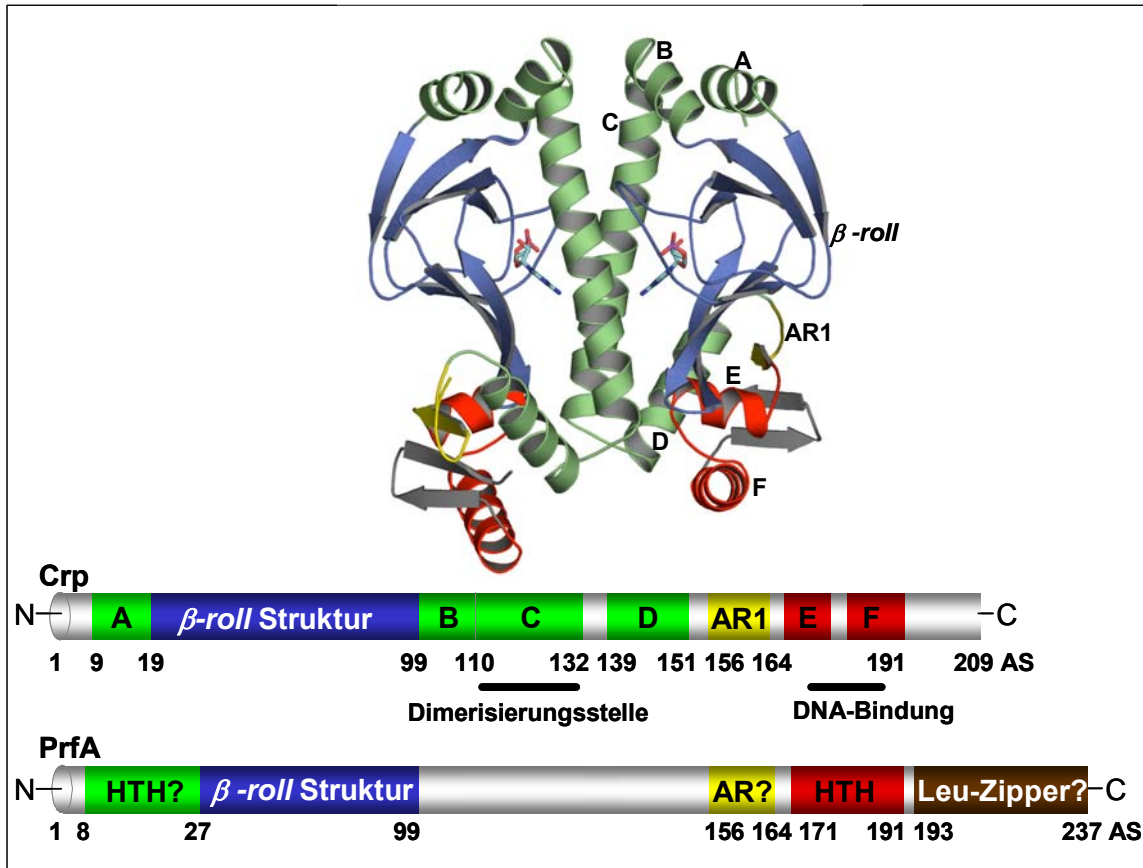


Abbildung 4: Kristallstruktur von Cap aus *E. coli* und schematischer Vergleich mit PrfA aus *L. monocytogenes*.

In der oberen Bildhälfte ist die Struktur von Cap als Bändermodell mit cAMP dargestellt (PDB-ID 1G6N). Die Farben der Domänen sind im darunter liegenden Schema wiedergegeben. Die Buchstaben A-D kennzeichnen α -Helices. Der als AR1 (activating region) bezeichnete Bereich ist für die Ribosomenbindung bei Cap notwendig. Zahlen unterhalb der farbigen Rechtecke zeigen den Beginn und das Ende der Domänen an. Die mit einem Fragezeichen versehenen Domänen sind putative Motive in PrfA. Die α -Helices E und F in Cap bilden das für die DNA-Bindung wichtige Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH-Motiv).

Zwei funktionell wichtige Strukturelemente von Cap konnten durch Sequenzvergleich auch für PrfA vorhergesagt werden (Abbildung 4) (Lampidis *et al.*, 1994). Zum Einen das C-terminale HTH-Motiv, das für die Bindung von Cap an eine spezifische, 22 Basenpaare (bp) lange, palindromische DNA-Sequenz in Zielpromotoren verantwortlich ist. PrfA bindet ebenfalls eine spezifische, 14 bp lange, palindromische DNA-Sequenz, die als PrfA-Box bezeichnet wird. Die Aminosäuresequenz des postulierten HTH-Motivs von PrfA ist ca. 70 % homolog zu der des Cap. Das zweite gemeinsame Strukturmerkmal ist ein N-terminales, 8-strängiges, antiparalleles β -Faltblatt, das zu einer als β -Rolle (β -roll) bekannten Struktur gefaltet ist und zwischen den β -Strängen jeweils ein charakteristisches Glycin aufweist. PrfA besitzt eine ähnliche Aminosäure-Region mit vergleichbar konservierten Glycinen. Bei Cap ist innerhalb dieser β -roll-Struktur eine Bindungsstelle für zyklisches AMP (cAMP), dem Aktivator von Cap, lokalisiert. In Gram-positiven Bakterien ist cAMP hingegen als intrazellulärer Botenstoff unbekannt (Hueck & Hillen, 1995) und

vermag zudem PrfA nicht zu aktivieren (Vega *et al.*, 1998). Über die beschriebenen Ähnlichkeiten hinaus sind in PrfA noch homologe Aminosäuresequenz-Bereiche zur α -Helix α D und zur aktivierenden Region (AR1) von Cap anzutreffen. Eine Funktion von α D ist in Cap die Weiterleitung der durch Bindung von cAMP induzierten strukturellen Änderungen an das HTH-Motiv (Harman, 2001), während AR1 für die Interaktion mit der RNA-Polymerase verantwortlich ist (Benoff *et al.*, 2002).

PrfA besitzt neben diesen konservierten Domänen jedoch einige Bereiche, die in Cap nicht vorkommen. Am N-Terminus von PrfA ist eine Aminosäuresequenz identifiziert worden, die möglicherweise ein weiteres HTH-Motiv ausbildet, während eine 25 Aminosäuren umfassende Verlängerung am C-Terminus als Leucin-Zipper diskutiert wurde. PrfA-Mutanten, in denen diese 25 Aminosäuren deletiert sind, sind inaktiv (Lampidis *et al.*, 1994). Der tatsächliche strukturelle Aufbau von PrfA lässt sich jedoch erst mit der Kristallstruktur aufklären.

1.3.2 Regulation der PrfA-Synthese und Aktivität

Sowohl die Synthese als auch die Aktivität von PrfA unterliegen einer strengen Kontrolle durch verschiedene Regulationsmechanismen. Bereits auf der Transkriptionsebene wird die Expression von PrfA über drei verschiedene Promotoren kontrolliert. Zwei Wachstums-regulierte Promotoren des *prfA*-Gens, *prfAP1* und *prfAP2*, liegen unmittelbar vor dem *prfA*-Gen und führen zu monocistronischen Transkripten von 0.9 kb und 0.8 kb Länge (Mengaud *et al.*, 1991; Freitag *et al.*, 1993; Freitag & Portnoy, 1994; Renzoni *et al.*, 1999). Die Transkription eines PrfA-abhängigen, vor dem *plcA*-Gen gelegenen Promotors führt demgegenüber zu einer bicistronischen *plcA-prfA*-mRNA (Mengaud *et al.*, 1991; Camilli *et al.*, 1993; Freitag *et al.*, 1993; Freitag & Portnoy, 1994). Posttranskriptionell unterliegt die untranslatierte 5'-Region (UTR) der *prfA*-mRNA einer Thermoregulation, indem die UTR bei niedrigen Temperaturen (< 30°C) eine Haarnadelschleife ausbildet. Durch die daraus resultierende Maskierung der Ribosomenbindestelle wird die Translation von PrfA unterbunden (Johansson *et al.*, 2002).

Des Weiteren scheint PrfA darüber hinaus auch auf posttranslatieller Ebene reguliert zu werden. So wird zum Beispiel durch Zugabe von Cellobiose zum Medium die Expression von *hly*, *plcA* und *plcB* herunterreguliert, obgleich die zelluläre Menge an PrfA konstant bleibt (Klarsfeld *et al.*, 1994; Milenbachs *et*

al., 1997; Renzoni *et al.*, 1997). Unklar bleibt, ob PrfA modifiziert und folglich inaktiviert wird, oder ob zusätzliche Faktoren synergistisch mit PrfA Einfluss auf die Genexpression ausüben.

Demgegenüber ist die Expression von Virulenzfaktoren bei Kultivierung von *L. monocytogenes* in *brain-heart infusion* (BHI)-Medium zunächst auch sehr schwach (Ripio *et al.*, 1996). Wird dann Aktivkohle zum BHI-Medium hinzugegeben, zeigt PrfA eine erhöhte Aktivität. Es wurde geschlussfolgert, dass Aktivkohle einen listeriellen Autorepressor adsorbiert, der PrfA direkt oder indirekt zu inhibieren vermag (Ermolaeva *et al.*, 2004).

Die beschriebenen Beobachtungen legen den Schluß nahe, dass PrfA einen bisher unbekannten Aktivator benötigt, der die stimulatorischen Umweltsignale auf PrfA überträgt bzw. mit dem potentiellen Autorepressor konkurriert (Milenbachs *et al.*, 1997; Renzoni *et al.*, 1997; Ermolaeva *et al.*, 2004).

1.3.3 Regulation der Virulenzgenexpression durch PrfA

Die 14 bp lange, palindromische DNA-Sequenz „TTAACA-NN-TGTTAA“ wurde als Erkennungssequenz für PrfA mittels *Footprinting*-Versuche identifiziert (Freitag *et al.*, 1992). Diese Nukleotidsequenz wird als PrfA-Box bezeichnet und beginnt zwischen den Positionen -58 und -33 relativ zum Startcodon (Mengaud *et al.*, 1989; Freitag *et al.*, 1993; Vega *et al.*, 1998). In Tabelle 1 sind die PrfA-Boxen einiger listerieller Virulenzfaktoren dargestellt. Insbesondere die Sequenzen der PrfA-Box von *hly* und *plcA* sind mit der genannten Sequenz identisch, während die Promotoren von *mpl* und *actA* bzw. *inlA* in einer bzw. zwei Basen davon abweichen.

Die Produktion einzelner Virulenzfaktoren wird offenbar über die PrfA-Konzentration reguliert. Promotoren mit perfekter PrfA-Box wie *hly* und *plcA* werden bereits bei einer geringfügig erhöhten PrfA-Menge transkribiert, während die Promotoren von *actA* und *plcB* eine signifikant höhere PrfA-Menge benötigen (Bohne *et al.*, 1994; Bubert *et al.*, 1997).

Bei der Transkriptom-Analyse von *L. monocytogenes* wurden jedoch auch Gene identifiziert, die von PrfA reguliert werden und dennoch keine PrfA-Box aufweisen (Milohanic *et al.*, 2003). Diese Gene besitzen eine Sigma B-abhängige Promotorsequenz, die primär von Sigma B und folglich nur indirekt über PrfA reguliert wird (Rauch *et al.*, 2005).

Tabelle 1: Sequenzvergleich verschiedener PrfA-Boxen.

Promotoren	PrfA-Box (5' → 3')	Virulenzfaktoren
<i>hly</i>	TTAACA TT TGTAA	Listeriolysin
<i>plcA</i>	TTAACA AA TGTAA	PI-PLC
<i>actA</i>	TTAACA AA TGTAAg	ActA
<i>mpl</i>	TTAACA AA TGTaAA	Metalloprotease
<i>inlA</i>	aTAACA TA aGTAA	InlA

Kleinbuchstaben kennzeichnen Abweichungen von der perfekten PrfA-Box.

1.4 Die hyperhämolytische PrfA - Variante PrfA_{G145S}

Die Untersuchung der Listeriolysin- und Lecithinase-Produktion verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme führte zur Entdeckung hyperhämolytischer Listerien-Stämme (Ripio *et al.*, 1996), darunter NCTC 7973, EGD-A und P14-A. Allerdings handelt es sich dabei um Stämme, die bereits eine längere Zeit im Labor kultiviert worden waren und nicht solche, die direkt aus Infektionsherden isoliert wurden. Während die Expression von Virulenzfaktoren in Wildtyp-Listerien-Stämmen erst durch die Zugabe von Aktivkohle zum Medium dramatisch ansteigt, produzieren die hyperhämolytischen Listerien-Stämme LLO und Lecithinase bereits in so hoher Menge, dass sie durch die Zugabe von Aktivkohle nicht weiter gesteigert wird (Ripio *et al.*, 1997b).

Die hyperhämolytischen Listerien-Stämme unterscheiden sich von Wildtyp-Stämmen durch ein verändertes PrfA, in dem die Aminosäure Gly145 durch Serin substituiert ist (PrfA_{G145S}). Einige Stämme weisen darüber hinaus eine weitere Punktmutation im *prfA*-Gen auf, die zu dem Austausch Cys229Tyr führt. Komplementationsversuche zeigten, dass die Substitution Gly145Ser allein für die konstitutive Überexpression der Virulenzgene verantwortlich ist (Ripio *et al.*, 1997b).

Der Austausch Gly145Ser führt zu einer Daueraktivierung von PrfA unabhängig von Umweltsignalen, die normalerweise zur Inaktivierung von PrfA führen würden, wie reichhaltiges Medium, niedrige Temperatur und fermentierbare Kohlenhydrate (Ripio *et al.*, 1997a; Ripio *et al.*, 1997b; Behari & Youngman, 1998). Wie beschrieben, ist die Aktivität von PrfA_{G145S} auch durch die Zugabe von Aktivkohle zum Medium nicht zu erhöhen. Trotz erhöhter Virulenzfaktorexpression hyperhämolytischer Listerien *in vitro*, ist

die Infektionsrate bei Mäusen gegenüber Wildtyp-Listerien unverändert (Ripio *et al.*, 1996).

PrfA_{G145S} weist viele Ähnlichkeiten zu Cap_{A144T} auf, eine Variante des Cap, dessen Alanin an Position 144 durch ein Threonin ausgetauscht wurde (Weber *et al.*, 1987). Cap_{A144T} ist ebenfalls konstitutiv aktiv, d. h. ohne Bindung von cAMP transkriptionell aktiv (Harman *et al.*, 1986; Harman, 2001). Wie Cap_{A144T} bindet auch PrfA_{G145S} DNA mit höherer Affinität als der jeweilige Wildtyp (Vega *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 2004).

Wiederum nähren diese Beobachtungen die Vermutung, PrfA werde wie Cap über einen Kofaktor aktiviert. Die Kofaktor-unabhängige Mutante PrfA_{G145S} würde dabei in ihrer Konformation den aktivierten Zustand repräsentieren (Ripio *et al.*, 1997b; Vega *et al.*, 1998).

1.5 Ziel des Teilprojektes PrfA

Die zeitliche und räumliche Regulation der Virulenzgenexpression ist ein entscheidendes Kriterium für das Überleben der Listerien im Wirtsorganismus. Der Hauptregulator der Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes* ist PrfA, der positive regulatorische Transkriptionsfaktor A. Um Einblicke in die Funktionsweise des Transkriptionsfaktors zu ermöglichen, sollte die dreidimensionale Struktur von PrfA gelöst werden. Für die Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie musste zunächst ein Produktions- und Reinigungsprotokoll entwickelt werden, das den hohen Reinheits- und Homogenitätsanforderungen für die Kristallisation von PrfA Rechnung trägt.

Die konstitutiv aktive Mutante PrfA_{G145S} zeigt eine stärkere DNA-Bindung als PrfA-Wildtyp (PrfA_{wt}) (Vega *et al.*, 2004). Um zu klären, inwiefern die erhöhte DNA-Bindung durch strukturelle Änderungen bedingt ist, sollte zudem die Struktur von PrfA_{G145S} gelöst und anschließend mit PrfA_{wt} verglichen werden.

Die kontrollierte Expression der Virulenzfaktoren in *L. monocytogenes* erfolgt durch die Bindung von PrfA an eine spezifische, 14 bp lange, PrfA-Box genannte DNA-Sequenz, die sich in den PrfA-abhängigen Promotoren befindet. Die Bindung des rekombinanten PrfA an die PrfA-Box sollte mit biochemischen Methoden überprüft und erstmalig durch Bestimmung der Bindungsaffinität von PrfA_{G145S} und PrfA_{wt} für DNA quantifiziert werden. Um die Erkennung von DNA durch PrfA im Detail zu untersuchen, sollte die dreidimensionale Struktur des PrfA-DNA-Komplexes mittels Röntgenkristallo-

graphie gelöst werden. Da die Herstellung von geeigneten Kristallen zur Strukturaufklärung bei Protein-DNA-Komplexen erfahrungsgemäß sehr schwierig ist (Tan *et al.*, 2000), sollten Oligonukleotide verschiedener Länge und mit unterschiedlichen 5'- oder 3'- Überhängen für die Kristallisation eingesetzt werden.

1.6 *Staphylococcus aureus* - Mikrobiologie und Pathogenese

Die Gattung *Staphylococcus* gehört zu den Gram-positiven, unbeweglichen Kokken, die fakultativ anaerob sind (Abbildung 5). Sie sind meist haufenförmig oder auch traubenartig gruppiert und besitzen einen Durchmesser von etwa 1 µm. Staphylokokken sind gegenüber Umwelteinflüssen wie hoher Salzkonzentration, Temperaturen bis 50°C oder Austrocknung sehr resistent.



Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus*.
Übernommen von <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>

Staphylococcus aureus unterscheidet sich von den weiteren 30 Arten der Staphylokokken durch die charakteristische und namensgebende goldgelbe Pigmentierung seiner Kolonien und die Produktion von Katalase und Koagulase. Beide Enzyme sind für die Pathogenität von *S. aureus* essentiell. Die Katalase ist ein Enzym, das Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff disproportioniert und dadurch die bei der phagozytären Abwehr gebildeten Sauerstoffradikale antagonisiert (Martin *et al.*, 1976). Die Koagulase setzt Fibrinogen zu Fibrin um und erlaubt es den Bakterien, sich mit einem Schutzwall aus Fibrin zu umgeben (Akiyama *et al.*, 1997).

Für den gesunden Menschen stellt *S. aureus*, das bei ungefähr 30 % der Bevölkerung regelmäßiger Bestandteil der Normalflora von Haut und Schleimhäuten ist, keine Gefahr dar.

Bei hospitalisierten Patienten, immungeschwächten Personen sowie Neugeborenen kann *S. aureus* jedoch lebensbedrohliche Infektionen hervorrufen. Neben lokalen Entzündungen wie etwa Furunkel, Gerstenkorn und Eiterbeulen kann *S. aureus* schwere, Toxin-vermittelte Erkrankungen auslösen, chronische Entzündungen wie Osteomyelitis (Knochenmarksentzündung), Arthritis (Gelenkentzündung) und Endokarditis (Herzinnenhautentzündung) verursachen oder zu systemischen Erkrankungen führen (Pragman & Schlievert, 2004). Hierzu zählen z. B. Lungenentzündungen oder Septikämien, die nicht selten einen tödlichen Verlauf nehmen. Die Hauptursache für Krankenhausbedingte Infektionen sind Kontaminationen durch medizinische Fremdkörper wie Katheter und Wundnähte.

Staphylokokkale Infektionen beginnen oft durch Verletzungen der Haut, so dass die Erreger sich von diesen lokalen Gewebedefekten über Lymphwege oder die Blutbahn in andere Körperregionen ausbreiten können. Die Phagozytose von *S. aureus* durch Endothelzellen spielt bei pathogenen Prozessen wie Endokarditis oder Sepsis eine zentrale Rolle (Hamill *et al.*, 1986; Menzies & Kourteva, 1998).

S. aureus besitzt eine Vielzahl von Virulenzfaktoren. Neben den bereits genannten Enzymen Katalase und Koagulase sind unter anderem auch folgende Proteine an Infektionsprozessen beteiligt: die oberflächenassoziierten *clumping*-Faktoren A und B, die eine Bindung an die extrazelluläre Matrix ermöglichen (McDevitt *et al.*, 1997), die Fibronektin-bindenden Proteine, die die Invasion in die Wirtszellen ermöglichen (Greene *et al.*, 1995) sowie das staphylokokkale Protein A (Spa), das die Phagozytose durch Makrophagen verhindert (Palmqvist *et al.*, 2002).

S. aureus zählt mit *E. coli* zu den Bakterien, die am häufigsten Lebensmittelvergiftungen hervorrufen. Verantwortlich dafür sind die staphylokokkalen Enterotoxine SEA und SEB (Balaban & Rasooly, 2000). Darüber hinaus produziert *S. aureus* eine Vielzahl an Exotoxinen, die verschiedene Krankheiten hervorrufen (Dinges *et al.*, 2000). Das *toxic shock syndrome-toxin-1* (TSST-1) löst zum Beispiel das toxische Schock-Syndrom aus (Todd, 1988), während die exfoliativen Toxine ETA und ETB an dem *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS) beteiligt sind, das zur Ablösung (Exfoliation) der oberen Hautschicht bei Neugeborenen führt (Ladhani *et al.*, 1999).

S. aureus ist ein wichtiges, opportunistisches Pathogen, das eine Vielzahl an Virulenzfaktoren bildet sowie als Besiedler der Schleimhäute schnell in den Wirtsorganismus eindringen kann. Durch die Zunahme multiresistenter

Bakterien ist das Spektrum Staphylokokken-wirksamer Antibiotika deutlich eingeschränkt (Hiramatsu *et al.*, 2001). Eine verstärkte Suche nach alternativen Behandlungsstrategien ist daher von großer Dringlichkeit. Eine detaillierte Beschreibung der infektionsbedingten Wechselwirkungen zwischen Bakterium und Wirtszelle dürfte die Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung der Staphylokokken erleichtern.

1.7 C3-Exoenzyme aus *S. aureus*

Neben zahlreichen Virulenzfaktoren produziert *S. aureus* C3-Exoenzyme, deren Funktion in der staphylokokkalen Pathogenese derzeit noch nicht eindeutig geklärt ist. Drei dieser C3-Exoenzyme konnten in *S. aureus* identifiziert werden, die als C3stau1 (Inoue *et al.*, 1991), C3stau2 (Wilde *et al.*, 2001) und C3stau3 (Yamaguchi *et al.*, 2001) bezeichnet werden.

C3stau1 wurde zunächst als *epidermal cell differentiation inhibitor* (daher der ursprüngliche Name EDIN) entdeckt, der die morphologische Differenzierung von Keratinozyten *in vitro* inhibiert (Sugai *et al.*, 1990) und die Hyperplasie (Vergrößerung des Gewebes durch die Zunahme der Zellzahl) der Epidermis *in vivo* induziert (Sugai *et al.*, 1992). Dabei wurde eine ADP-Ribosyltransferase (ADP-RT)-Aktivität (Sugai *et al.*, 1992) beobachtet, so dass C3stau1 in die Familie der C3-ähnlichen ADP-RT eingeordnet wurde (s. Kap. 1.7.1, S. 20).

Hinweise darauf, dass die C3-Exoenzyme eine wichtige Funktion in Infektionsprozessen spielen könnten, zeigt z. B. eine Studie, in der C3stau1 die Migration von Endothelzellen verhindert und damit die Wundheilung blockiert (Aepfelbacher *et al.*, 1997).

Weiterhin waren Gene, die für C3stau2 und C3stau3 kodieren, häufiger in *S. aureus*-Stämmen vorhanden, die aus Infektionsherden isoliert wurden (7.8 %), als in *S. aureus*-Stämmen, die in nasalen Schleimhäuten vorkommen (3.7 %) (Czech *et al.*, 2001). Ein ähnliches Verhältnis wurde auch für die exfoliativen Toxine A und B beschrieben (Ladhani *et al.*, 1999).

In einer Studie von 2001 wurde erstmals C3stau1 in pathogenen *S. aureus*-Stämmen entdeckt, die bei 9 Monate alten Babys aus eitrigen Sekreten in der Luftröhre isoliert wurden. Diese Babys hatten eine Verengung der Atemwege, was als *acquired subglottic stenosis* (ASGS) bezeichnet wird. ASGS kann durch Komplikationen bei der Einführung eines Tubus bei Neugeborenen entstehen, die eine geschwächte Wundheilung besitzen. Neben C3stau1 wurde auch TSST-1 in diesen Staphylokokken entdeckt (Yamada *et al.*, 2001). Da

C3stau1 die Migration von Endothelzellen und damit die Wundheilung inhibiert (siehe oben), könnte dieses Exoenzym für die ASGS bei den Neugeborenen verantwortlich sein.

Es ist daher davon auszugehen, dass die C3-Exoenzyme eine wichtige Rolle in der Pathogenese von *S. aureus* spielen.

1.7.1 C3stau1-3 sind Mitglieder der C3-ähnlichen ADP-RT-Familie

Bei der bereits erwähnten ADP-Ribosyltransferase-Aktivität binden die ADP-RT zunächst NAD^+ (im Folgenden als NAD bezeichnet) und spalten es in ADP-Ribose und Nikotinamid. Anschließend transferieren sie den ADP-Ribose-Anteil des NAD auf eine spezifische Aminosäure des Substrats, während Nikotinamid ins Cytosol entlassen wird (Abbildung 6).

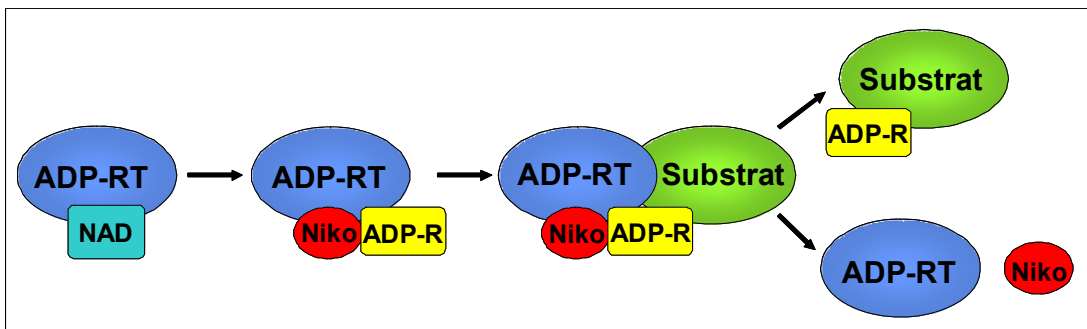


Abbildung 6: Schema der ADP-Ribosylierung.

Die ADP-Ribosyltransferasen (ADP-RT) binden Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) und spalten es in Nikotinamid (Niko) und ADP-Ribose (ADP-R). Schließlich erfolgt der Transfer der ADP-Ribose an ein spezifisches Substrat und Nikotinamid wird freigesetzt.

Der Hauptrepräsentant der Familie der C3-ähnlichen ADP-RT ist das Protein C3 aus *Clostridium botulinum* (C3bot1) (Aktories *et al.*, 1988; Popoff *et al.*, 1991). Dieses Enzym hat eine zweite Isoform (C3bot2), die eine Aminosäureidentität von 65 % zu C3bot1 aufweist (Nemoto *et al.*, 1991). Aufgrund der ADP-Ribosyltransferase-Aktivität und ihrer Sequenzhomologie zu C3bot1/2 werden die C3-Exoenzyme aus *S. aureus* (C3stau1-3) in die Familie der C3-ähnlichen ADP-RT eingeordnet. Weitere Mitglieder dieser Familie sind C3lim aus *Clostridium limosum* (Just *et al.*, 1992) und C3cer aus *Bacillus cereus* (Just *et al.*, 1995a). Während die Aminosäuresequenz von C3lim zu 63 % identisch mit C3bot1 ist, weisen die Aminosäuresequenzen von C3cer und C3stau1-3 eine Identität von nur 30-35 % zu C3bot1 auf. Die C3-Exoenzyme sind stark basische Proteine ($\text{pI} > 9$) mit einem Molekulargewicht von 24-26 kDa. Sie werden als Monomere mit einer Signalsequenz von ca. 40 Aminosäuren

produziert, die während der Sekretion abgespalten wird. Alle Mitglieder der Familie der C3-ähnlichen ADP-RT modifizieren spezifisch die Rho GTPasen RhoA, -B und -C, indem sie den ADP-Ribose-Anteil N-glykosidisch mit Asn41 verknüpfen.

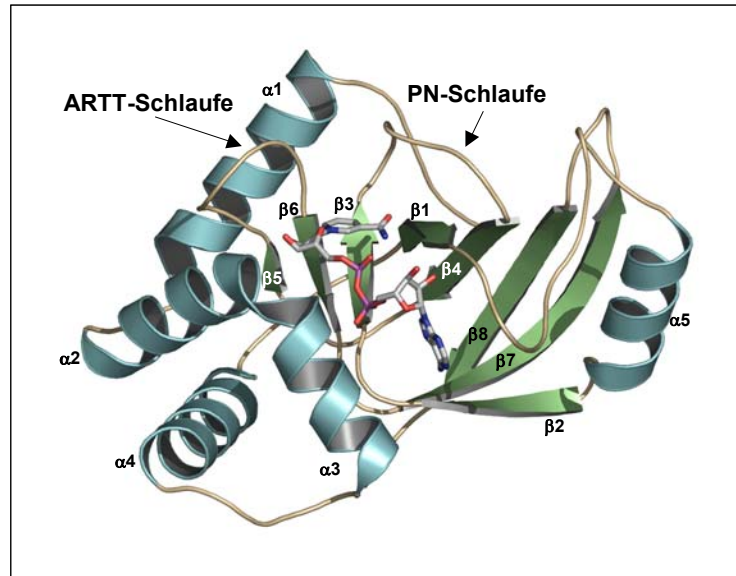


Abbildung 7: Die dreidimensionale Struktur von C3bot1 mit NAD (PDB-ID 1GZF).

Das von C3 aus *C. botulinum* gebundene NAD ist als Stäbchen-Modell dargestellt. Die α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) sind in türkis, die β -Faltblätter ($\beta 1$ - $\beta 8$) in grün und die Schleifen in beige dargestellt. Die ADP-ribosylating turn (ARTT)-Schleife und die Phosphat-Nikotinamid (PN)-Schleife sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Zu Beginn der Arbeit war die dreidimensionale Struktur von C3bot1 ohne und mit gebundenem NAD bekannt (Han *et al.*, 2001; Menetrey *et al.*, 2002). Das aktive Zentrum von C3bot1 besteht aus einem gemischten α/β -Motiv mit einem β -sandwich-Kern (Abbildung 7). Dieser β -sandwich-Kern besteht aus einem 5-strängigen, gemischten β -Faltblatt, das senkrecht zu einem 3-strängigen, antiparallelen β -Faltblatt angeordnet ist. Vier α -Helices umgeben das 3-strängige β -Faltblatt, während eine weitere α -Helix das 5-strängige β -Faltblatt umgibt. Die NAD-Bindungstasche befindet sich zwischen dem β -sandwich-Kern und einer α -Helix $\alpha 3$.

Die Funktion der C3-ähnlichen ADP-RT als Virulenzfaktoren ist im Hinblick auf das Fehlen einer Rezeptorbindungs- oder Translokationsdomäne noch unklar. Doch aufgrund ihrer ausgeprägten Substratspezifität werden die C3-ähnlichen ADP-RT als pharmakologisches und zellbiologisches Werkzeug für die Aufklärung des RhoA-Signaltransduktionsweges eingesetzt.

1.7.2 ADP-Ribosylierung als wichtiger Schritt für pathogene Mechanismen

Posttranslationale ADP-Ribosylierung wird von ADP-RT katalysiert, die sowohl in Eukaryonten und Prokaryonten als auch in Viren vorkommen. Besonders pathogene Erreger nutzen die ADP-Ribosylierungsreaktion zur Modifizierung eukaryotischer Proteine und damit zur Schädigung der Wirtszellen aus.

Die prokaryotischen ADP-RT lassen sich drei Gruppen zuordnen: den AB-Toxinen, den binären Toxinen und den C3-Exoenzymen (Tabelle 2). AB-Toxine bestehen aus zwei Domänen, von denen die A-Domäne die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität besitzt, während die B-Domäne für den Transfer der A-Domäne in die eukaryotische Zelle verantwortlich ist und folglich als Translokationsdomäne bezeichnet wird. Zu den AB-Toxinen gehört zum Beispiel das Diphtherie-Toxin (DT) (Collier, 2001), das Diphthamid im Elongationsfaktor 2 (EF-2) modifiziert und als Hauptvirulenzfaktor in *Corynebacterium diphtheriae* die Ursache für Diphtherie ist. Das Cholera-Toxin aus *Vibrio cholera* (Spangler, 1992), ebenfalls ein AB-Toxin, modifiziert ein spezifisches Arginin oder Cystein in der α -Untereinheit der G-Proteine und blockiert dadurch die GTPase-Aktivität. Das daraufhin permanent aktive G-Protein stimuliert über die Bindung an Adenylatcyclase die Bildung von cAMP, dessen erhöhte intrazelluläre Konzentration einen großen Ausstrom von Natrium-Ionen und Wasser in den Darmlumen bewirkt und folglich für die Diarrhö bei Cholera verantwortlich ist.

Tabelle 2: Einteilung der prokaryotischen ADP-RT in drei Klassen.

	Substrate	Physiologische Folge
AB-Toxine		
Diphtherie-Toxin	EF-2 (Diphthamid)	Inhibition der Proteinsynthese
Exotoxin A (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	EF-2 (Diphthamid)	
Cholera-Toxin	G-Protein (Arg)	Interaktion mit der Signaltransduktionskette
Pertussis-Toxin	G-Protein (Cys)	
<i>E. coli</i> Hitze-labiles Enterotoxin	G-Protein (Arg)	
Binäre Toxine		
<i>B. cereus</i> VIP2	Aktin (Arg)	Inhibition der Aktinpolymerisation
<i>C. botulinum</i> C2 Toxin	Aktin (Arg)	
<i>C. perfringens</i> Iota-Toxin	Aktin (Arg)	
<i>C. spiroforme</i> Toxin	Aktin (Arg)	
<i>C. difficile</i> Toxin	Aktin (Arg)	
C3-Exoenzyme		
<i>C. botulinum</i> C3bot1/2	RhoA, -B, -C (Asn)	Inhibition Rho-abhängiger Prozesse
<i>C. limosum</i> C3lim	RhoA, -B, -C (Asn)	
<i>B. cereus</i> C3cer	RhoA, -B, -C (Asn)	
<i>S. aureus</i> C3stau1-3	RhoA, -B, -C, -E, Rnd3 (Asn)	

Binäre Toxine bestehen aus zwei kooperierenden Proteinen. Ein Protein bildet dabei einen Kanal in der Wirtsmembran aus, durch den das zweite Protein in die Zelle gelangen kann, um dort die ADP-Ribosylierung durchzuführen. Zu den binären Toxinen gehören unter anderem VIP2 (*vegetative insecticidal protein*) aus *Bacillus cereus* (Han *et al.*, 1999), C2 Toxin aus *C. botulinum* (Barth *et al.*, 1998) und das Iota-Toxin aus *C. perfringens* (Simpson *et al.*, 1987; Tsuge *et al.*, 2003). Alle Mitglieder der binären Toxine modifizieren ein spezifisches Arginin des Aktins und inhibieren dadurch die Aktinpolymerisation.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Familien besitzen die C3-Exoenzyme keine Translokationsdomäne (s. Kap. 1.7.1, S. 20). Einige prokaryotische ADP-RT, wie z. B. das kürzlich entdeckte SpyA aus *Streptococcus pyogenes* (Coye & Collins, 2004), lassen sich nicht in diese Gruppen einteilen, da sie entweder keine Translokationsdomäne und/oder ein breites Substratspektrum besitzen.

Trotz niedriger Aminosäuresequenz-Homologie besitzen alle prokaryotischen ADP-RT eine ähnliche NAD-Bindungstasche und ein konserviertes Glutamat

(Glu214 bei C3bot1) (Han & Tainer, 2002). Dieses Glutamat ist absolut erforderlich für den Transfer der ADP-Ribose auf die Akzeptor-Aminosäure des Substrats und wird daher als katalytisches Glutamat bezeichnet. Es befindet sich in einem strukturellen *ADP-ribosylating turn turn* (ARTT)-Motiv, das sowohl bei C3-Exoenzymen als auch bei binären Toxinen identifiziert wurde (Han *et al.*, 2001). Die ARTT-Schleife befindet sich bei C3bot1 zwischen den β -Strängen $\beta 5$ - $\beta 6$ (Abbildung 7). Es ist an der ADP-Ribosylierungsreaktion beteiligt und für die Substraterkennung verantwortlich. Neben dem katalytischen Glutamat ist ein Glutamin (Gln212 bei C3bot1), das zwei Positionen vor dem Glutamat lokalisiert ist, als eine wichtige Aminosäure des ARTT-Motivs identifiziert worden. Dieses Glutamin erhöht die Nukleophilie der Akzeptor-Aminosäure (Asparagin bei Rho GTPasen). Eine aromatische Aminosäure (Phe209 bei C3bot1), die sich drei Positionen vor dem Glutamin in dem ARTT-Motiv befindet, ist ebenfalls an der Erkennung des Substrats involviert und auch in den binären Toxinen konserviert.

Ein weiteres wichtiges Motiv, das essentiell für die NAD-Bindung bei C3-Exoenzymen ist, wird Phosphat-Nikotinamid (PN)-Motiv genannt (Han *et al.*, 2001; Menetrey *et al.*, 2002). Es umfasst die Aminosäuren 137-146 in C3bot1 (Zählung ohne Signalsequenz) und liegt in der Schleife $\beta 3$ - $\beta 4$ (Abbildung 7). Diese PN-Schleife begrenzt die NAD-Bindungstasche zusammen mit der ARTT-Schleife und stabilisiert dabei die NAD-Bindung. Ein in C3-Exoenzymen konserviertes Arginin (Arg186 bei C3bot1) liegt in dieser PN-Schleife und ist für die ADP-Ribosylierungsaktivität wichtig (Menetrey *et al.*, 2002; Wilde *et al.*, 2003).

1.7.3 Rho GTPasen als Substrate für C3-ähnliche ADP-RT

C3-ähnliche ADP-RT modifizieren ausschließlich Mitglieder der kleinen Rho GTPasen. Diese Familie umfasst mehr als 15 GTPasen, darunter RhoA, -B, -C, -D und -G, Rac1-3, Cdc42, Rnd1, Rnd2 sowie Rnd3/RhoE (Ridley, 2000; Jaffe & Hall, 2002; Wennerberg & Der, 2004). Am besten charakterisiert sind die Mitglieder der Rho- und Rac-Familie sowie Cdc42, die bei der Signalübertragung von Oberflächenrezeptoren zum Aktinzytoskelett eine wichtige Rolle spielen und dadurch die unterschiedlichen Bewegungen einer Zelle kontrollieren. Auch an der Ausbildung von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten sind Rho GTPasen beteiligt (Bishop & Hall, 2000).

Die meisten der Rho GTPasen unterliegen einem Aktivierungszyklus und wechseln zwischen zwei Konformationszuständen, einem aktiven, GTP-gebundenem Zustand und einem inaktiven, GDP-gebundenem Zustand. Dieser Wechsel wird streng von zwei regulatorischen Proteingruppen reguliert. Die Guaninnukleotid-freisetzenden Proteine (GEF - *guanine nucleotide exchange factor*) aktivieren GTPasen, indem sie den Austausch von GDP gegen GTP fördern. Die GTPase-aktivierenden Proteine (GAP) erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität (Hydrolyse von GTP) der Rho-Proteine. Sie beschleunigen damit den Übergang vom aktiven GTP-gebundenen in den inaktiven, GDP-gebundenen Zustand. *Guanine nucleotide dissociation inhibitor* (GDI) komplexieren GDP-gebundene GTPasen im Cytosol und hemmen dadurch die Dissoziation von gebundenem GDP. Die aktive, GTP-gebundene Form der Rho GTPasen ist meistens an der Membran lokalisiert und interagiert dort mit vielen zellulären Effektoren.

Rho GTPasen sind bevorzugte Zielproteine für verschiedene bakterielle Toxine und Effektoren (Just *et al.*, 2001; Boquet & Lemichez, 2003; Aktories & Barbieri, 2005). Sie werden dabei durch bakterielle Cytotoxine in ihren verschiedenen Zuständen (GDP- oder GTP-gebunden) aktiviert oder inaktiviert. Die Aktivierung der Rho GTPasen erfolgt z. B. durch Deamidierung (Hoffmann *et al.*, 2004) oder Transglutaminierung (Masuda *et al.*, 2000), während die Inaktivierung durch kovalente Modifikationen wie z.B. durch Glykosylierungen erreicht wird (Just *et al.*, 1995b).

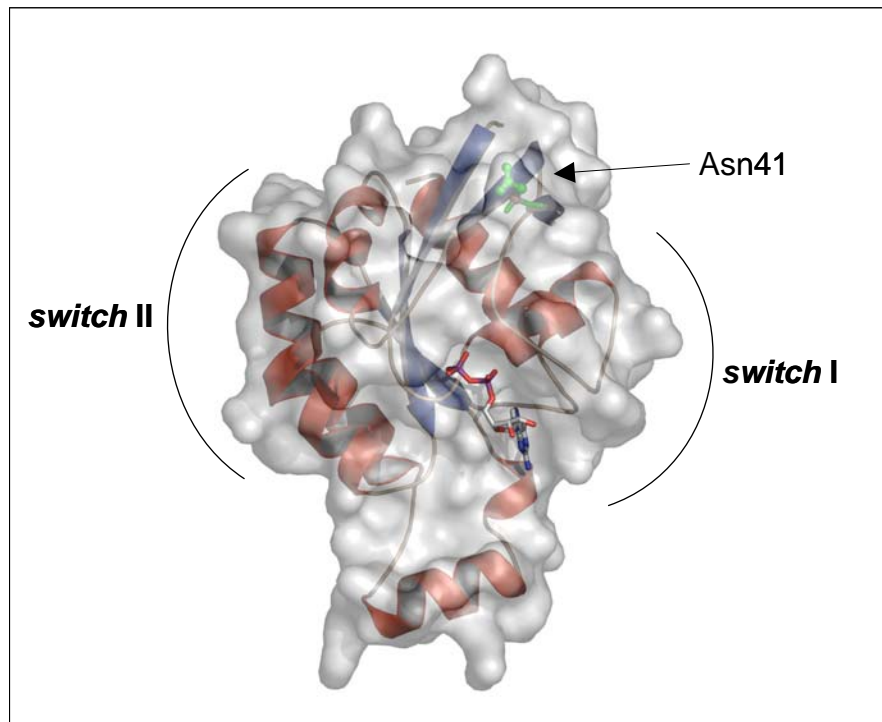


Abbildung 8: Die dreidimensionale Struktur von RhoA mit gebundenem GDP.

Die Struktur von RhoA ist als Bändermodell dargestellt (PDB-ID 1FTN), umgeben von einer halbtransparenten Oberfläche. α -Helices sind in rot und β -Faltblätter in blau dargestellt. GDP ist als Stäbchen-Präsentation wiedergegeben. Die für die ADP-Ribosylierung wichtige Aminosäure Asn41 ist in Kugel-Stab-Darstellung in grün hervorgehoben.

Die Familie der C3-ähnlichen ADP-RT inaktiviert spezifisch die Rho GTPasen RhoA, -B und -C durch ADP-Ribosylierung. Dabei wird die ADP-Ribose des NAD spezifisch auf Asn41 der RhoA-C übertragen (Sekine *et al.*, 1989). Die dreidimensionale Struktur von RhoA zeigt, dass Asn41 in unmittelbarer Nähe zu der *switch*-I Region liegt (Abbildung 8) (Wei *et al.*, 1997). Die *switch*-I Region unterliegt je nach gebundenem Nukleotid unterschiedlichen Konformationen und spielt eine Schlüsselrolle in der Weiterleitung von Signalen (Wittinghofer & Nassar, 1996).

Durch die ADP-Ribosylierung ist die Aktivierung der Rho GTPasen durch GEFs inhibiert (Sehr *et al.*, 1998) und auch die Dissoziation der GDI von dem Rho-GDI-Komplex wird blockiert (Genth *et al.*, 2003). Ebenso ist die Bindung von RhoA an die Membran nach ADP-Ribosylierung reduziert (Fujihara *et al.*, 1997; Genth *et al.*, 2003).

Die ADP-Ribosylierung von Rho GTPasen hat nur eine geringe Auswirkung auf die Nukleotid-Bindung oder auf die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyseaktivität. Auch die Bindung von Effektormolekülen wie z. B. Proteinkinase N wird nicht inhibiert (Sehr *et al.*, 1998).

Die Inaktivierung und Inhibierung von Rho-abhängigen Prozessen äußert sich besonders in der Neuverteilung von Aktinfilamenten und der Depolymerisation von Stressfasern (Paterson *et al.*, 1990; Wiegers *et al.*, 1991). Nach Zugabe von C3bot1 zu kultivierten Zellen ist deren Abrundung aufgrund zerstörter Stressfasern zu beobachten (Chardin *et al.*, 1989). Gleiches gilt auch für andere Mitglieder der C3-ähnlichen ADP-RT (Wilde *et al.*, 2001). Weiterhin wurde festgestellt, dass durch ADP-ribosyliertes Rho Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert bleiben (Yamamoto *et al.*, 1993).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ADP-Ribosylierung von Rho die nachfolgenden Signalkaskaden in den Wirtszellen erheblich beeinflusst.

1.8 C3stau2 - eine besondere ADP-RT?

C3stau2 wird von dem pathogenen *S. aureus*-Stamm HMI6 produziert (Wilde *et al.*, 2001). Es besitzt eine Sequenzidentität von 70 % zu C3stau1, 64 % zu C3stau3 und lediglich 31 % zu C3bot1.

Interessanterweise weist C3stau2 im Vergleich zu C3bot1 eine erweiterte Substratspezifität auf. C3stau2 ADP-ribosyliert neben RhoA, -B und -C auch die Rho GTPasen RhoE und Rnd3 (Wilde *et al.*, 2001). Vor kurzem wurde entdeckt, dass auch C3stau1 fähig ist, RhoE und Rnd3 zu modifizieren (Wilde *et al.*, 2003). RhoE und Rnd3 sind auf der Ebene der Aminosäuresequenz identisch mit der Ausnahme, dass Rnd3 am N-Terminus 15 zusätzliche Aminosäuren besitzt. Die Rnd-Unterfamilie (Rnd 1, 2 und 3/RhoE) der Rho GTPasen kann im Gegensatz zu RhoA GTP nicht hydrolysieren (Foster *et al.*, 1996) und ist dadurch dauerhaft aktiv. Da die Überexpression von Rnd1 in NIH-3T3-Zellen zu einem Verlust von Aktinstressfasern und *focal adhesions* führt, wird angenommen, dass Rnd-Proteine als funktionelle Antagonisten zu den typischen Rho-Proteinen agieren (Nobes *et al.*, 1998).

Die für die ADP-Ribosylierung notwendige Akzeptor-Aminosäure in RhoE/Rnd3 ist Asn44, äquivalent zu Asn41 in RhoA. Trotz der unterschiedlichen Funktionen von RhoA und RhoE/Rnd3 wurde in Fibroblasten durch die ADP-Ribosylierung dieser GTPasen der gleiche Abrundungseffekt beobachtet (Wilde *et al.*, 2001).

Eine weitere Besonderheit von C3stau2 ist die Tatsache, dass die ADP-Ribosylierungs-Aktivität von C3stau2 nicht von RalA blockiert wird. RalA ist bei der Kontrolle von Zellproliferationen und Ras-vermittelten Zelltransformationen beteiligt (Urano *et al.*, 1996). RalA wird von den C3-Exoenzymen nicht

ADP-ribosyliert, aber es bindet mit hoher Affinität an die C3-Exoenzyme C3lim, C3cer und C3bot1 (Wilde *et al.*, 2002a). Dadurch wird die ADP-Ribosylierungsaktivität von C3bot1 inhibiert. Bei C3stau2 führt RalA jedoch nicht zu einer Inhibition seiner ADP-Ribosylierungs-Aktivität.

Welche Funktion C3stau2 in der Pathogenese von *S. aureus* ausübt und welche Auswirkung die erweiterte Substratspezifität hat, ist bis jetzt noch nicht geklärt.

1.9 Ziel des Teilprojektes C3stau2

Die im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der C3-ähnlichen ADP-Ribosyltransferasen erweiterte Substratspezifität sowie die von RalA unbeeinflusste ADP-Ribosylierung machen C3stau2 zu einem einzigartigen C3-ähnlichen Exoenzym. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die erweiterte Substratspezifität von C3stau2 strukturell erklärt werden kann. Dafür sollte die dreidimensionale Struktur von C3stau2 mittels Röntgenkristallographie gelöst werden.

Da über den genauen Mechanismus der ADP-Ribosylierung nur spekuliert werden kann, sollte weiterhin mit Hilfe der dreidimensionalen Struktur des C3stau2-RhoA-Komplexes detaillierte Kenntnisse über die Wechselwirkung dieser beiden Proteine gewonnen werden. Dafür musste zunächst RhoA in ausreichender Quantität und Qualität hergestellt werden.

Da Enzym-Substrat-Komplexe meist transient sind, gestaltet sich die Komplex-Kristallisation in der Regel schwierig. In dieser Arbeit sollten daher Strategien entwickelt werden, die zu einem stabilen C3stau2-RhoA-Komplex führen. Dabei sollten ein NAD-Analagon, das nicht hydrolysiert werden kann sowie eine Aminosäuresubstitution in RhoA zum Einsatz kommen.

2 Ergebnisse

2.1 Strukturanalyse von PrfA

2.1.1 Produktion und Reinigung von PrfA

PrfA ist der einzige, bisher bekannte Transkriptionsfaktor in *Listeria monocytogenes*, der direkt die Expression der Virulenzfaktoren reguliert. Eine Aufklärung der dreidimensionalen Struktur auf atomarer Ebene soll Einblicke in die Funktionsweise von PrfA geben. Eine wichtige Voraussetzung für die Strukturbestimmung eines Proteins mittels Röntgenkristallographie ist zunächst die effiziente Gewinnung von Protein in ausreichender Quantität und Qualität durch Verwendung eines geeigneten Expressionssystems.

Die Produktion von rekombinantem PrfA sollte als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Histidin (His₆)–Anker erfolgen, da bei der Gewinnung von PrfA mit Hilfe des GST-Fusionssystems erhebliche Schwierigkeiten bei der Reinigung und Abspaltung des GST-Ankers auftraten (Appel, 2001). Dazu wurde zunächst das PrfA-Gen in den pQE30-Vektor kloniert, der eine hohe Expression durch den T5 Promotor verspricht und vor der *multiple cloning site* 6 Histidin-Codons trägt.

Die von Prof. Dr. Trinad Chakraborty (Universität Giessen) freundlicherweise zur Verfügung gestellte Plasmid-DNA pGEX-6P1-PrfA wurde als Matrize für die PCR eingesetzt. Als Primer dienten die zu den 5'- und 3'- Enden des PrfA-Gens komplementären Oligonukleotide. Diese Primer enthalten eine Schnittstelle für *Bgl*II bzw. *Pst*I, so dass eine Ligation in den mit *Bam*HI und *Pst*I geschnittenen pQE30-Vektor durchgeführt werden konnte. Das erhaltene Konstrukt pQE30-PrfA wurde mittels Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung überprüft.

Die heterologe Produktion des PrfA-Fusionsproteins erfolgte in *E. coli* M15 [pREP4]-Zellen. Um einen Überblick über die produzierten Mengen des Fusionsproteins und die Bildung von Einschlusskörpern in den Bakterienzellen zu erhalten, wurde zunächst die Proteinproduktion bei verschiedenen Temperaturen und mit unterschiedlichen Medien untersucht. Die größte Ausbeute an löslichem His₆-PrfA konnte nach 20 h mit 2xYT-Medium bei 20°C produziert werden.

Die Reinigung des His₆-PrfA-Proteins erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose. Dabei bindet der His₆-Anker des PrfA-Fusionsproteins an immobilisierte Nickel-Ionen. Um die Reinigung besser kontrollieren zu können, wurde nach verschiedenen Arbeitsschritten Proben entnommen. Diese Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Mit Hilfe eines Poly-Histidin-Antikörpers kann die Produktion des PrfA-Fusionsproteins nachgewiesen werden (Abbildung 9). Die Bindungskapazität der Ni-NTA-Agarose für His₆-PrfA war ausreichend für die Menge an produziertem PrfA, da im Durchlauf (Abb. 9) kaum PrfA, sondern größtenteils Fremdprotein enthalten war. Dennoch zeigte His₆-PrfA nur eine schwache Bindung an die Ni-NTA-Agarose, da es bereits bei niedrigen Imidazolkonzentrationen (10 mM) eluierte. Dies hatte zur Folge, dass die Eluat-Fraktion (Abb. 9, E1) noch stark verunreinigt war und weitere Reinigungsschritte erforderlich waren.

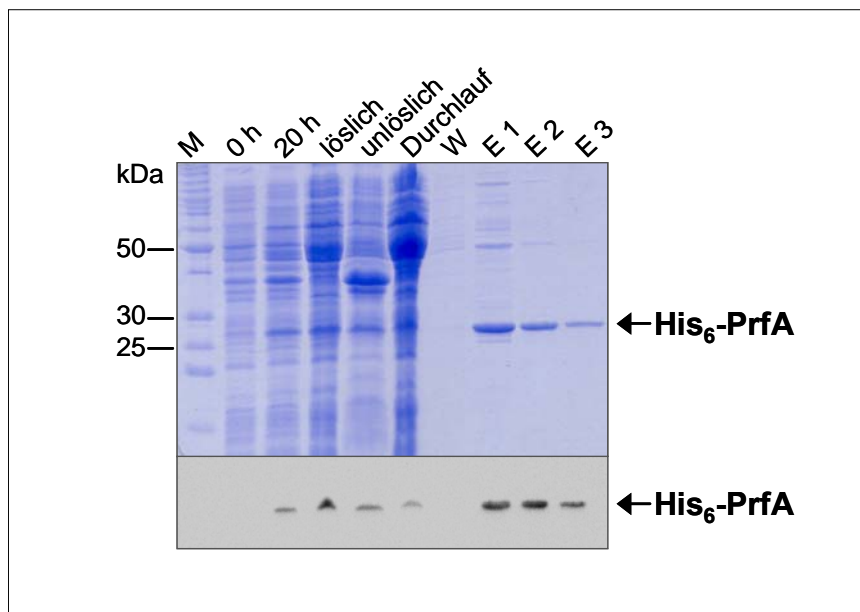


Abbildung 9: Reinigung von His₆-PrfA mit Ni-NTA-Agarose.

Nach verschiedenen Arbeitsschritten während der Reinigung wurden Proben entnommen und im 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte zum einen mit Coomassie-Blau-Färbung als auch im Western Blot über den His₆-Anker mit einem Histidin-Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper. 0 h = vor Induktion, 20 h = 20 h nach 0.1 mM IPTG-Induktion, W = Waschfraktion, E1-E3 = Eluatfraktionen mit 10 mM Imidazol, M = Molekulargewichtsstandard.

Noch verbliebene Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine wurden durch eine anschließende Kationenaustauschchromatographie (KAC) von dem PrfA entfernt.

Die PrfA-Eluatfraktion wurde vorab durch Dialyse in Dialyse-Puffer überführt, dessen pH-Wert von 6.7 eine Bindung des Proteins (der theoretisch ermittelte isoelektrische Punkt von PrfA liegt bei 8.4) an einen Kationenaustauscher ermöglicht. Vor dem Beladen der Säule (MonoS 10/10) mit Protein wurde diese zunächst mit 25 % Protein-Hochsalzpuffer äquilibriert. Da PrfA bei einer Salzkonzentration unterhalb von 250 mM NaCl ausfällt, wurde zur Reinigung ein Salzgradient von 250 mM bis 1 M NaCl gewählt. Im Chromatogramm zeigen sich bei einer Absorption von 280 nm (Abbildung 10, blaue Linie) zwei deutliche Absorptionsmaxima, die anschließend mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Das erste Maximum entspricht dem Durchlauf nicht-gebundener Proteine während der Beladung der Säule. Das zweite Absorptionsmaximum enthielt das Zielprotein PrfA, jedoch verunreinigt mit einigen Fremdproteinen, die vermutlich ähnliche Ladungseigenschaften aufweisen.

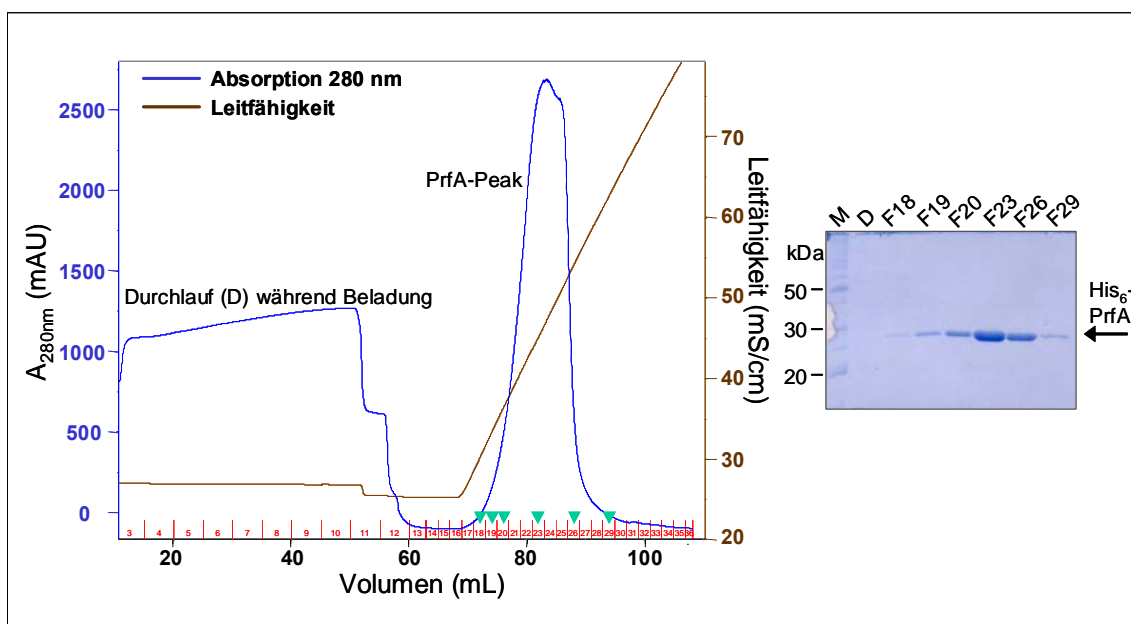


Abbildung 10: Reinigung von PrfA mittels Kationenaustauschchromatographie (KAC).

Das Chromatogramm der KAC zeigt die Trennung des PrfA von Verunreinigungen. Dargestellt ist auf der linken Ordinate die Absorption der Proteine bei 280 nm in mAU (blaue Linie) und auf der rechten Ordinate die Leitfähigkeit des Puffers in mS/cm (braune Linie). Die Abszisse zeigt in rot die Fraktionen und in schwarz das Volumen. Eluierte Fraktionen mit erhöhter A_{280nm} wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Eine Zuordnung der analysierten Fraktionen ist durch die grünen Pfeilspitzen angedeutet. M = Molekulargewichtsstandard.

Um die verbliebenen Fremdproteine in den PrfA-enthaltenden Fraktionen ebenfalls zu entfernen, wurden diese Fraktionen vereint, konzentriert und mit Hilfe der Gelfiltration nach ihrer Größe getrennt. Gleichzeitig konnte bei der Gelfiltration der Puffer des Proteins gewechselt werden. Aufgrund der Elution von PrfA bei einer hohen Salzkonzentration von 330 mM NaCl bei der KAC,

wurde für die Gelfiltration ein Puffer gewählt, der sich für die anschließende Kristallisation und Lagerung des Proteins als optimal erwies (50 mM NaH_2PO_4 pH 6.7, 250 mM NaCl).

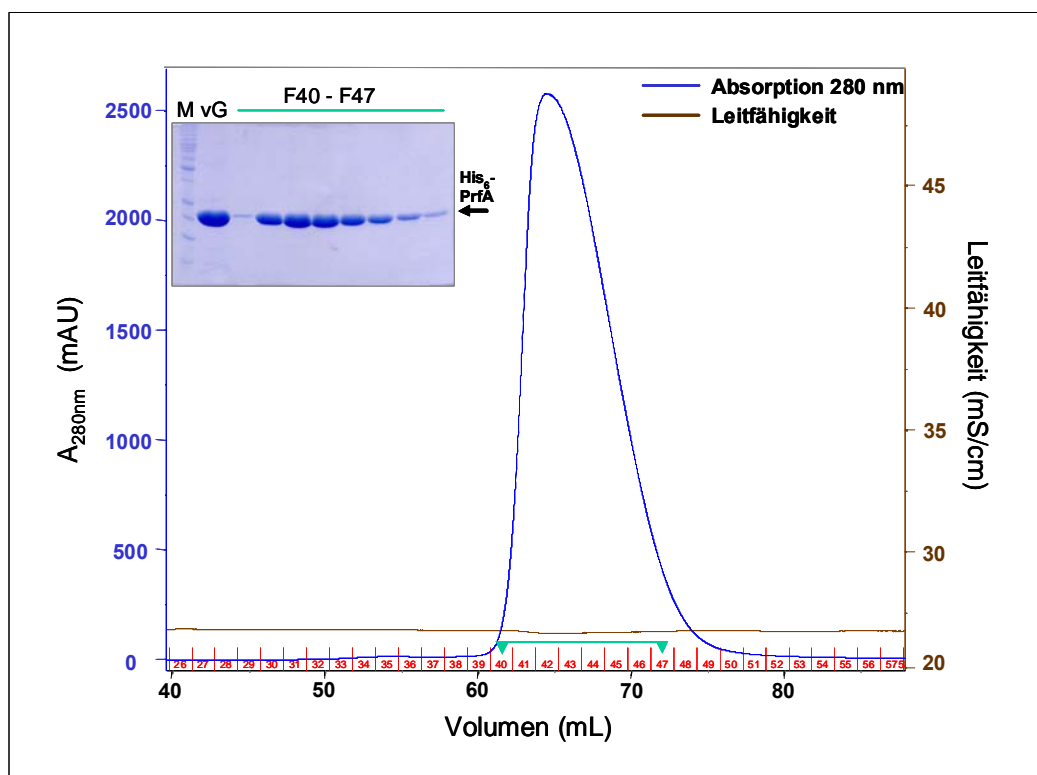


Abbildung 11: Reinigung von PrfA mittels Gelfiltration.

Das Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 75 *prep grade* 16/60) zeigt in blau die Absorption der Proteine bei 280 nm und in braun die Leitfähigkeit. Die Abszisse zeigt in rot die Fraktionen und in schwarz das Volumen. Das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Gel zeigt die analysierten Fraktionen mit erhöhter Absorption. In Spur 2 (vG) wurde die konzentrierte Proteinprobe vor der Gelfiltration aufgetragen. M = Molekulargewichtsstandard.

Die Gelfiltration (Superdex 75 *prep grade* 16/60, 50 mM NaH_2PO_4 pH 6.7, 250 mM NaCl) ergab ein einzelnes Absorptionsmaximum, das, wie die anschließende SDS-PAGE zeigte, reinem PrfA-Protein entspricht (Abbildung 11). Im gezeigten Fall wurden die Fraktionen 40 - 47 vereint, auf 5 mg/mL konzentriert und bei 4°C gelagert. Durch Vergleich der Elutionsvolumina von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht konnte das Molekulargewicht von PrfA in Lösung ermittelt werden. Dabei stellte sich heraus, dass PrfA mit einem Molekulargewicht von ca. 58 kDa als Dimer in Lösung vorliegt. Weiterhin wurde das Molekulargewicht mittels Massenspektrometrie bestätigt (57 kDa) und etwaige Modifikationen ausgeschlossen, die sich sonst in einer Massenzunahme gezeigt hätten. Eine N-terminale Sequenzierung der ersten 18 Aminosäuren des Proteins bestätigte die Aminosäuresequenz von His₆-PrfA.

Nach diesem Reinigungsprotokoll konnten bis zu 30 mg PrfA aus 2 L *E. coli*-Flüssigkultur in hohem Reinheitsgrad gewonnen und für die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden.

2.1.2 Kristallisation

Für die Röntgenstrukturanalyse ist die Produktion hochgeordneter Einkristalle von entscheidender Bedeutung. Ein kritischer Faktor für die Kristallisation ist die Gewährleistung der Homogenität der Proteinlösung. Mittels dynamischer Lichtstreuung wurde verifiziert, dass PrfA als homogene, monodisperse Lösung vorlag. Vor der Kristallisation wurde die PrfA-Lösung 10 min bei 14'000 U/min zentrifugiert, um eventuelle Schwebeteilchen oder Aggregate abzutrennen.

Da die Kristallisationseigenschaften von Proteinen nicht vorhersagbar sind, wurde die Kristallisation von PrfA unter einer Vielzahl von Bedingungen nach der Methode des sitzenden Tropfens bei 20°C getestet. Bereits nach 7 Tagen wurden unter zwei verschiedenen Bedingungen Kristalle desselben Habitus erhalten.

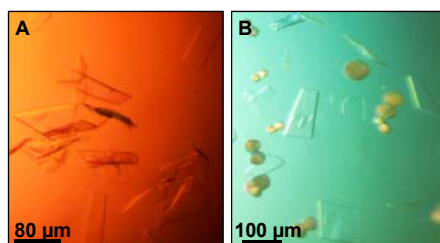


Abbildung 12: Erste Kristalle von PrfA.

Die Kristallisation von PrfA (5 mg/mL) erfolgte nach der Methode des sitzenden Tropfens bei 20°C. A) Kristalle aus dem *Crystal Screen* (0.4 M Ammoniumphosphat); B) Kristalle aus dem *Grid Screen PEG/LiCl* (30 % (w/v) PEG 6000, 0.1 M Hepes pH 7, 1 M LiCl).

Für eine erste Charakterisierung wurden die Kristalle an der GBF unter Verwendung von CuK α -Strahlung röntgenkristallographisch untersucht. Die plättchenartigen Kristalle aus dem *Crystal Screen* (Abbildung 12A) zeigten jedoch keine Beugung im Röntgenstrahl. Dagegen streuten die Kristalle aus dem *PEG/LiCl-Screen* (Abbildung 12B) bis zu einer Auflösung von 3.1 Å.

Zur Optimierung der Kristallqualität beider Ansätze wurden verschiedene Kristallisationsparameter wie Temperatur, pH-Wert, Fällungsmittel- und Salzkonzentration variiert sowie verschiedene Kryoschutzmittel ausgetestet.

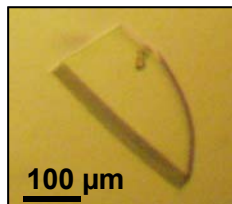


Abbildung 13: Optimierter PrfA-Kristall.

Der PrfA-Kristall wurde bei 20°C nach der Methode des hängenden Tropfens mit 20 % (w/v) PEG 6000, 1 M LiCl und 0.1 M Hepes pH 6.7 erhalten.

Bei einer Fällungsmittelkonzentration von 20 % (w/v) PEG 6000, einem pH-Wert von 6.7 mit 0.1 M Hepes, 1 M LiCl und 20°C konnten deutlich größere Kristalle als unter der Anfangsbedingung erzeugt werden (Abbildung 13).

2.1.3 Datensammlung und Prozessierung

Die Kristalle wurden mit einem Kryoschutzmittel (20 % (w/v) PEG 400) versetzt und in flüssigem Stickstoff auf 80 K schockgekühlt. Anschließend wurde ein vollständiger Datensatz von einem optimierten PrfA-Kristall an der Messstation BL1 des Synchrotron BESSY II in Berlin bei einer maximalen Auflösung von 2.7 Å im flüssigen Stickstoffstrom (100 K) aufgenommen. Die Wellenlänge der Synchrotron-Strahlung betrug 1.54 Å und als Detektor wurde ein MAR Research *image plate*-Detektor verwendet. Während der Messung wurde der Kristall um $\varphi = 240^\circ$ gedreht und dabei 300 Beugungsbilder aufgenommen. Diese wurden anschließend mit dem *HKL* Programmpaket prozessiert.

Für den PrfA-Kristall wurde die monokline Raumgruppe $P2_1$ mit den Gitterkonstanten $a = 56.0 \text{ Å}$, $b = 80.7 \text{ Å}$, $c = 61.0 \text{ Å}$ und $\beta = 111.9^\circ$ ermittelt. Die Vollständigkeit der Daten betrug 89.0 %. Eine Packungsanalyse ergab, dass zwei Moleküle PrfA in der asymmetrischen Einheit vorliegen (Matthews-Koeffizient $V_m = 2.3 \text{ Å}^3/\text{Da}$ und Lösungsmittelgehalt = 47.0 %) (Matthews, 1968). Da die Gelfiltration ebenfalls Hinweise auf ein PrfA-Dimer gegeben hatte, konnte von einem PrfA-Dimer in der asymmetrischen Einheit ausgegangen werden. Die Statistik der Datensammlung ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Übersicht der Datensammlung von PrfA.

	PrfA
Raumgruppe	P2 ₁
Gitterkonstanten	a = 56.0 Å, b = 80.7 Å, c = 61.0 Å, β = 111.9°
Anzahl einmaliger Reflexe	12402
Auflösungsbereich (Å) ¹	30-2.7 (2.8-2.7)
Vollständigkeit (%) ¹	89.0 (68.9)
Redundanz ¹	1.76 (2.1)
R _{sym} (%) ¹	9.0 (26.9)
I/ σ _I ¹	10.6 (3.1)
Wilson-Temperaturfaktor (Å ²)	60
Monomere/asymmetrischer Einheit	2

¹Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale der höchsten Auflösung.

2.1.4 Strukturlösung von PrfA durch Molekularen Ersatz

Die Strukturaufklärung von PrfA erfolgte durch die Methode des Molekularen Ersatzes mit dem Programm *EPMR*. Bei dieser Methode werden die Daten einer bereits bekannten Struktur verwendet, die eine hohe Ähnlichkeit mit der erwarteten Struktur aufweist. Durch Rotationen und Translationen soll dabei die Modellstruktur in räumliche Übereinstimmung mit der gesuchten Struktur gebracht werden. Zunächst wurde die Struktur von Cap (PDB-ID 1G6N; Aminosäuren 1 - 225, Sequenzidentität 20 %) als Suchmodell für die Positionierung von PrfA in der P2₁-Elementarzelle eingesetzt. Trotz Verwendung eines Polyalanin-Modells, bei dem nicht-konservierte Reste durch Alanin ersetzt wurden, konnte keine Lösung erhalten werden. Zu einem späteren Zeitpunkt während dieser Arbeit lag eine 2.8 Å-Kristallstruktur von PrfA in der Proteindatenbank vor (PDB-ID 1OMI; (Thirumuruhan *et al.*, 2003). Diese PrfA-Struktur wurde unter Verwendung anderer Kristallisationsbedingungen mit einer orthorhombischen Kristallpackung (P2₁2₁2₁) erhalten. Diese Struktur wurde als Modell für den Molekularen Ersatz verwendet. Für ein PrfA-Dimer wurden für die beste Lösung ein Korrelationskoeffizient von 56 % und ein R-Faktor von 50.6 % berechnet. Zusätzlich wurde die gefundene Lösung unter Verwendung des Programms *O* analysiert. Die Packungsanalyse zeigte keinerlei Überlagerungen oder unverhältnismäßig große Abstände zwischen den Molekülen.

2.1.5 Verfeinerung und Qualität der Daten

Die Verfeinerung der PrfA-Modellstruktur wurde durch abwechselnde Zyklen manueller Anpassung an die Elektronendichteverteilung mit dem Programm *O* und geometrischer Verfeinerung durchgeführt. Hierzu wurde das Programm *REFMAC* in Kombination mit *ARP/WARP* zur Lokalisation von Wassermolekülen eingesetzt. Da die asymmetrische Einheit ein PrfA-Dimer enthält, dessen Monomere sehr ähnlich gefaltet sein werden, wurden während des gesamten Verfeinerungsprozesses sog. NCS-(*non-crystallographic symmetry*)-Operatoren angewandt. Für das gesamte C _{α} -Gerüst und die Seitenketten der Dimerisierungshelix (AS 109-136) der beiden Monomere wurden dabei insgesamt eine starke Ähnlichkeit vorausgesetzt, während die NCS-Operatoren für die Seitenketten der N-terminalen Domäne (AS 4-99) „mittelstark“ und die der DNA-bindenden Domäne (AS 137-210) „locker“ gehalten wurden. Des Weiteren wurde angenommen, dass jedes PrfA-Monomer aus zwei Domänen (N-terminale Domäne und DNA-bindende Domäne) besteht, die sich relativ zueinander bewegen. Daher wurde die Verfeinerung ebenfalls unter Einbezug einer TLS-Verfeinerung angewandt. Für das PrfA-Strukturmodell konnte, unter Verwendung von Daten bis zu einer maximalen Auflösung von 2.7 Å, der R-Faktor auf 24.4 % reduziert werden, während der freie R-Faktor für die verfeinerte Struktur bei 28.5 % liegt. Sowohl die TLS-Verfeinerung als auch die NCS-Operatoren haben dabei entscheidend zur Reduktion der R-Faktoren beigetragen. Die Verfeinerungsstatistik für PrfA ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Verfeinerungsstatistik der PrfA-Struktur.

	PrfA
Auflösungsbereich (Å)	56-2.7
Anzahl der Reflexe	11790
durchschnittlicher Temperaturfaktor (Å ²)	16.5
R-Faktor (%)	24.4
freier R-Faktor (%)	28.5
Anzahl der Wassermoleküle	57
Standardabweichung der Bindungslängen von Idealwerten (Å)	0.015
Standardabweichung der Bindungswinkel von Idealwerten (°)	1.9
Ramachandran-Plot (%):	
erlaubter Bereich	90.6
zusätzlich erlaubter Bereich	8
großzügig erlaubter Bereich	0.7
nicht erlaubter Bereich	0.7

Zur Kontrolle der Modellqualität wurden verschiedene Analysen mit den Programmen *PROCHECK* und *WHATIF* durchgeführt. Der von *PROCHECK*-generierte Ramachandran-Plot der PrfA-Struktur zeigte, dass 98.6% aller Hauptkettentorsionswinkel in den erlaubten und zusätzlich erlaubten Regionen liegen (Tabelle 4). Die sechs Aminosäuren (Lys25, Val186, Ser187, Ser204, Ser204*, Asn203*)(Aminosäuren des zweiten Monomers werden mit einem Sternchen gekennzeichnet), die in den großzügiger erlaubten und in den nicht erlaubten Bereichen liegen, befinden sich jeweils in den flexiblen Schlaufenbereichen der PrfA-Struktur und sind aufgrund unzureichender Qualität der Elektronendichte nicht genauer zu positionieren. Die statistische Verteilung der Abweichung von Bindungslängen und -winkel von Idealwerten, ist laut *WHATIF* im angemessenen Rahmen. Das heißt, die Gewichtung geometrischer und kristallographischer Beiträge während der Verfeinerung ist entsprechend der Auflösung bei 2.7 Å ausgewogen.

2.1.6 Die Tertiärstruktur von PrfA

Die dreidimensionale Struktur von PrfA wurde mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse auf atomarer Ebene erfolgreich gelöst. PrfA besteht aus 2 Monomeren, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden (Abbildung 14). Die Standardabweichung für äquivalente C $_{\alpha}$ -Atompositionen beider Monomere zueinander beträgt lediglich 0.45 Å. Jedes Monomer ist aus zwei großen Domänen aufgebaut, die über eine lange α -Helix (α C, AS 109-137) miteinander verbunden sind. Die N-terminale Domäne (blau, AS 1-108) besteht aus einem 8-strängigen, antiparallelen β -Fass mit *jelly roll*-Topologie, das von zwei α -Helices (α A und α B) flankiert wird. Die C-terminale Domäne (rosa, AS 138-237) besteht aus 6 α -Helices (α D- α I) und einem 4-strängigen, antiparallelen β -Faltblatt (β 9- β 12). Das für die DNA-Bindung wichtige HTH-Motiv (dunkel rosa) wird von den α -Helices α E (169-174) und α F (184-195) gebildet. Die Schleife zwischen den α -Helices α E- α F (gepunktete Linie) ist in der Elektronendichte nicht definiert, was auf einen flexiblen und deshalb ungeordneten Bereich schließen lässt. Ein weiterer Hinweis für die erhöhte strukturelle Flexibilität ist ein höherer durchschnittlicher Temperaturfaktor B der C-terminalen DNA-bindenden Domäne (79 Å) im Vergleich zu der N-terminalen Domäne (53 Å). Für die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren, die den His₆-Anker enthalten, war ebenfalls keine interpretierbare Elektronendichte zu sehen.

Im Zentrum der Dimerisierungsfläche befinden sich die langen α C-Helices. Aufgrund vieler aliphatischer und aromatischer Aminosäureresten in den α Cs finden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den beiden Monomeren statt. Insbesondere die Stapelung (*stacking*) von Phenylalaninresten im N-terminalen Bereich der α C führt zur Dimer-Bildung. Auch die Schleife β 6- β 7 ist an der Dimerisierung durch Wasserstoffbrücken-Bindungen mit α C beteiligt.

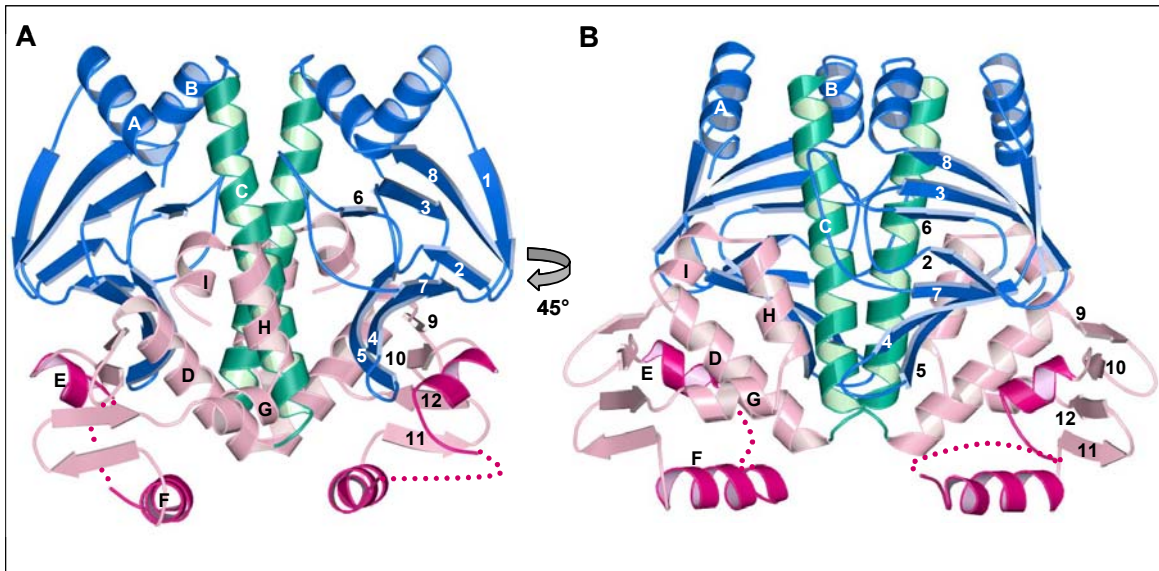


Abbildung 14: Struktur von PrfA.

In A) ist die Struktur von PrfA als Bändermodell dargestellt. α -Helices sind als Spiralen (A-I) und β -Stränge (1-12) als Pfeile gezeigt. Die Domänen von PrfA sind farblich unterschiedlich markiert: die N-terminale Domäne ist blau, die Dimerisierungshelix (α C) grün und die C-terminale Domäne rosa eingefärbt. Das HTH-Motiv ist in dunkel rosa hervorgehoben und die nicht-geordnete Schlaufe α E- α F ist als gepunktete Linie angedeutet. Die α -Helices sind sequentiell mit Buchstaben benannt (linkes Monomer) und die β -Stränge durch Zahlen (rechtes Monomer). B) Zur besseren Darstellung der DNA-bindenden Domäne wurde die Struktur gegenüber A) um 45° um die vertikale Achse gedreht.

Im Vergleich zum Transkriptionsfaktor Cap, dem Prototyp der Crp/Fnr-Familie, besitzt PrfA drei zusätzliche C-terminale α -Helices (α G- α I). Aufgrund der in dieser Arbeit aufgeklärten Struktur kann die Hypothese widerlegt werden, dass diese Domäne einen Leucin-Zipper bildet (Lampidis *et al.*, 1994). Die hier gelöste Struktur von PrfA offenbart, dass die α -Helices α G- α I sowohl an intra- als auch an intermolekularen Wechselwirkungen innerhalb des PrfA-Dimers beteiligt sind. Intramolekulare Wechselwirkungen finden zum Beispiel zwischen Asn237- N_δ (α I) und Tyr152- O_ζ (α D) statt. Auch Leu221 (α H) bildet über den Amidstickstoff eine Wasserstoffbrücke zu Asp133- $O_{\delta 2}$ (α C) aus. Intermolekulare Wechselwirkungen werden zum Beispiel zwischen Lys220- N_ζ (α H) des einen Monomers zu Tyr82*-O (β 6- β 7) des anderen Monomers gebildet. Die Bedeutung dieser α -Helices wird jedoch dadurch untermauert, dass eine PrfA-Deletionsmutante, der die α -Helices α H und α I fehlen, DNA nicht mehr bindet (Herler *et al.*, 2001).

Die DNA-bindende Domäne wird folglich durch eine gegenüber Cap erweiterte Dimer-Grenzfläche stabilisiert, die hauptsächlich durch hydrophobe Kontakte zwischen den α Cs sowie durch hydrophile Kontakte zwischen α C des

einen Monomers und der Schlaufe $\beta 6$ - $\beta 7^*$ des anderen Monomers gebildet wird.

2.1.7 Strukturlösung der PrfA_{G145S}-Mutante

PrfA_{G145S} ist eine konstitutiv aktive Mutante von PrfA, die in hyperhämolytischen Laborstämmen von *Listeria monocytogenes* entdeckt wurde (Ripio *et al.*, 1996). Um zu klären, ob strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Proteinen (PrfA und PrfA_{G145S}) zu finden sind, die mit stärkerer DNA-Bindung korrelieren, sollte die dreidimensionale Struktur von PrfA_{G145S} gelöst werden. Dazu wurde zunächst mittels ortsspezifischer Mutagenese Gly145 durch ein Serin ausgetauscht.

Die Arbeiten zur Reinigung, Kristallisation und Strukturaufklärung wurden von Gregor Hagelüken im Rahmen seiner Diplomarbeit (Hagelüken, 2004) durchgeführt und werden an dieser Stelle zur Unterstützung der hier durchgeführten Untersuchungen kurz zusammengefasst.

Die Reinigung von PrfA_{G145S} erfolgte gemäß dem Protokoll von PrfA. PrfA_{G145S} kristallisierte unter den Bedingungen 12 % (w/v) PEG 8000, 100 mM Na-Mes pH 6.9 und 300 mM Na-Acetat. Es konnte ein vollständiger Datensatz bis zu einer Auflösung von 2.3 Å unter Verwendung von Synchrotronstrahlung (Beamline BW6, DESY, Hamburg) aufgenommen werden. PrfA_{G145S} kristallisierte mit 4 Dimeren pro asymmetrischer Einheit in der monoklinen C-zentrierten Raumgruppe C2 mit den Gitterkonstanten $a = 117.2$ Å, $b = 100.2$ Å, $c = 189.5$ Å und $\beta = 90.3^\circ$. Im Folgenden wird zur besseren Differenzierung der PrfA-Wildtyp als PrfA_{wt} bezeichnet.

2.1.8 Strukturelle Unterschiede zwischen PrfA_{wt} und PrfA_{G145S}

Um strukturelle Unterschiede zwischen PrfA_{wt} und PrfA_{G145S} zu analysieren, wurden beide Strukturen mit dem Programm *LSQKAB* iterativ übereinander gelagert, indem nur die C $_{\alpha}$ -Atome berücksichtigt wurden, die nach Überlagerung weniger als 2.5 Å auseinanderliegen.

Wie erwartet sind beide PrfA-Strukturen im Prinzip sehr ähnlich. Im Detail sind jedoch zahlreiche Unterschiede zu erkennen, die über das ganze Molekül verteilt sind. Die Standardabweichung für alle gemeinsamen C $_{\alpha}$ -Atompositionen zwischen PrfA_{wt} und PrfA_{G145S} liegt bei 1.4 Å, wobei die C-terminalen Domänen (2.0 Å) deutlich stärker voneinander abweichen als die

N-terminalen Domänen (0.6 Å). Zur Akzentuierung der strukturellen Unterschiede zwischen PrfA_{wt} und PrfA_{G145S} ist in Abbildung 15 die Überlagerung der stärker voneinander abweichenden Bereiche dargestellt. Die PrfA_{wt}-Struktur ist in hellgrau und die von PrfA_{G145S} in den bereits verwendeten Farben wie in Abbildung 14 gezeigt.

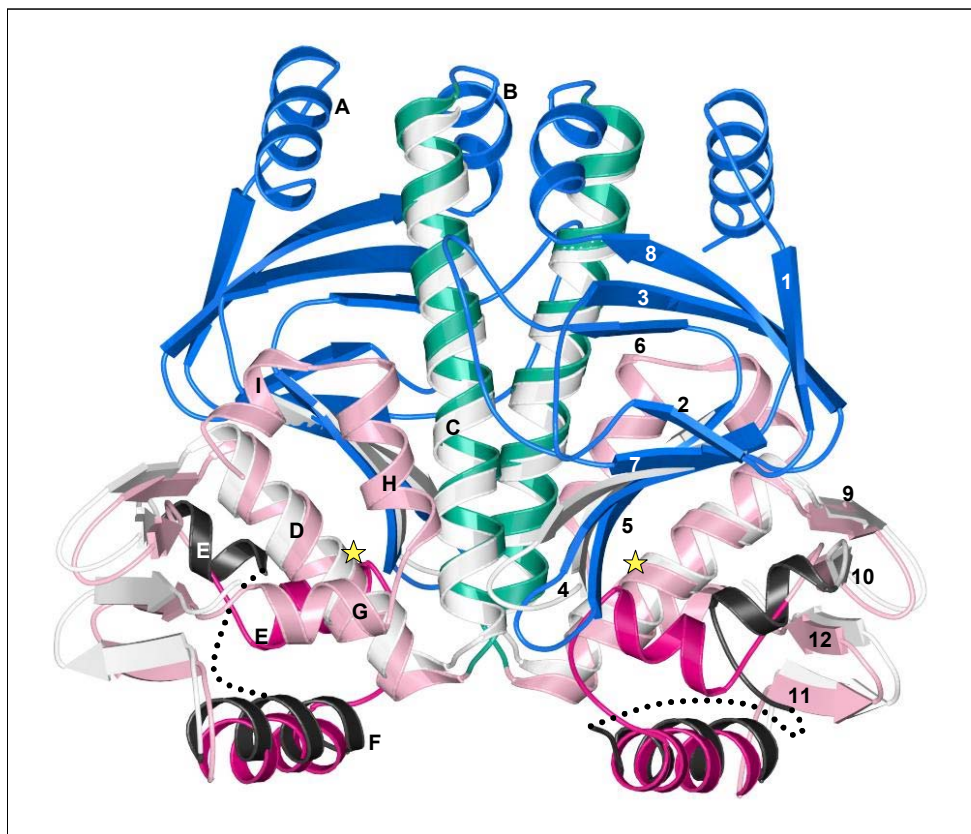


Abbildung 15: Überlagerung von PrfA_{wt} und PrfA_{G145S}.

Die Domänen von PrfA_{G145S} sind in den bereits verwendeten Farben der Abbildung 14 dargestellt, während PrfA_{wt} hellgrau gefärbt ist. Strukturell konservierte Bereiche von PrfA_{wt} (N-terminale Domäne, α G, α H und α I der C-terminalen Domäne) werden zur besseren Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Die Position der Mutation G145S ist durch einen gelben Stern gekennzeichnet. Das HTH-Motiv ist für PrfA_{G145S} in dunkel rosa und für PrfA_{wt} in dunkelgrau hervorgehoben.

Die wesentlichen Unterschiede zwischen PrfA_{wt} und PrfA_{G145S} befinden sich in der C-terminalen Region von α C, in α D als auch im HTH-Motiv. Im Folgenden soll auf diese Unterschiede näher eingegangen werden.

Einfluss der G145S Mutation auf die Konformation der α -Helices α C und α D

Die Mutation in α D führt zu strukturellen Unterschieden, die aber nicht nur auf diese α -Helix begrenzt sind. Aminosäure 145 befindet sich im mittleren Bereich der α -Helix α D und die eingefügte Serin-Seitenkette weist in Richtung der α -Helices α C und α H. Die Elektronendichte (Abbildung 16) zeigt deutlich,

dass sowohl das Ser145 in PrfA_{G145S} als auch das Gly145 in PrfA_{wt} gut definiert sind.

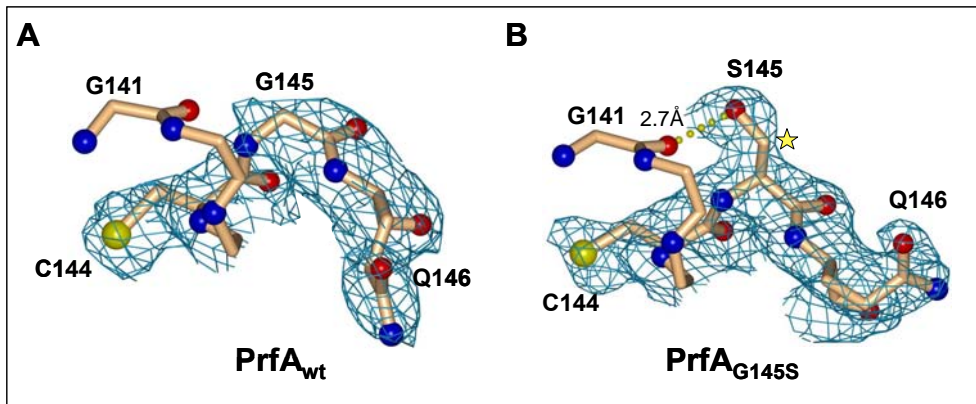


Abbildung 16: Darstellung der Elektronendichte in der Umgebung der Mutationsstelle G145S. Die Seitenketten, Carbonylgruppen und die Elektronendichte (konturiert bei 1.5 σ) der Aminosäuren 141-143 wurden aufgrund der besseren Übersichtlichkeit ausgespart. In A) ist PrfA_{wt} bei einer Auflösung von 2.7 Å, in B) PrfA_{G145S} bei einer Auflösung von 2.3 Å gezeigt. Die neu entstandene Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser145-O γ und Gly141-O ist als gelbe, punktierte Linie markiert. Die Mutationsstelle ist durch einen gelben Stern gekennzeichnet.

Eine direkte Folge der Mutation ist eine neue Wasserstoffbrücke zwischen Ser145-O δ (Hydroxylgruppe) und Gly141-O (Carbonyl-Sauerstoff), das ebenfalls in α D lokalisiert ist (Abbildung 16, gepunktete, gelbe Linie). Eine weitreichende Folge der Mutation ist eine Verschiebung der α -Helices α C und α D in PrfA_{G145S}. Im Vergleich zu PrfA_{wt} verschiebt sich α D um ca. 5 Å entlang der helikalen Achse in Richtung der Dimer-Grenzfläche (Abbildung 17B und C, Pfeile). Dadurch wird die Biegung von α C in PrfA_{wt} in PrfA_{G145S} teilweise begradigt (Abbildung 17A). Die Biegung von α C um ca. 11° erfolgt ab einer sog. Gelenkregion (*hinge region*) bei Ser127 (α C). Demzufolge rücken die C-terminalen Enden der α -Helix α C in PrfA_{G145S} im Vergleich zu PrfA_{wt} näher zusammen, so dass neue Wasserstoffbrückenbindungen entstehen (Ser135-O (α C)–Lys139-N ϵ (α D)) (Abbildung 17B).

Die Begradigung von α C in PrfA_{G145S} würde den hydrophoben Bereich zwischen α C und α D dem umgebenden Medium aussetzen. Kompensierend dreht sich die Seitenkette von Phe134 (α C) um ca. 90° und füllt dadurch den hydrophoben Zwischenraum zwischen α C und α D und bildet einen van-der-Waals-Kontakt mit der Methylen-Gruppe von Ser145 (Abbildung 17C).

Die Konformation der mutationsbenachbarten Aminosäure Gln146 ist ebenfalls verändert. In PrfA_{wt} zeigt die Amidgruppe von Gln146 in Richtung α E und bildet eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoff von Leu174

(α E) aus (nicht gezeigt). In PrfA_{G145S} zeigt die Amidgruppe von Gln146 in Richtung α C und wechselwirkt über Wasserstoffbrückenbindungen mit der ζ -Aminogruppe von Lys130 (α C).

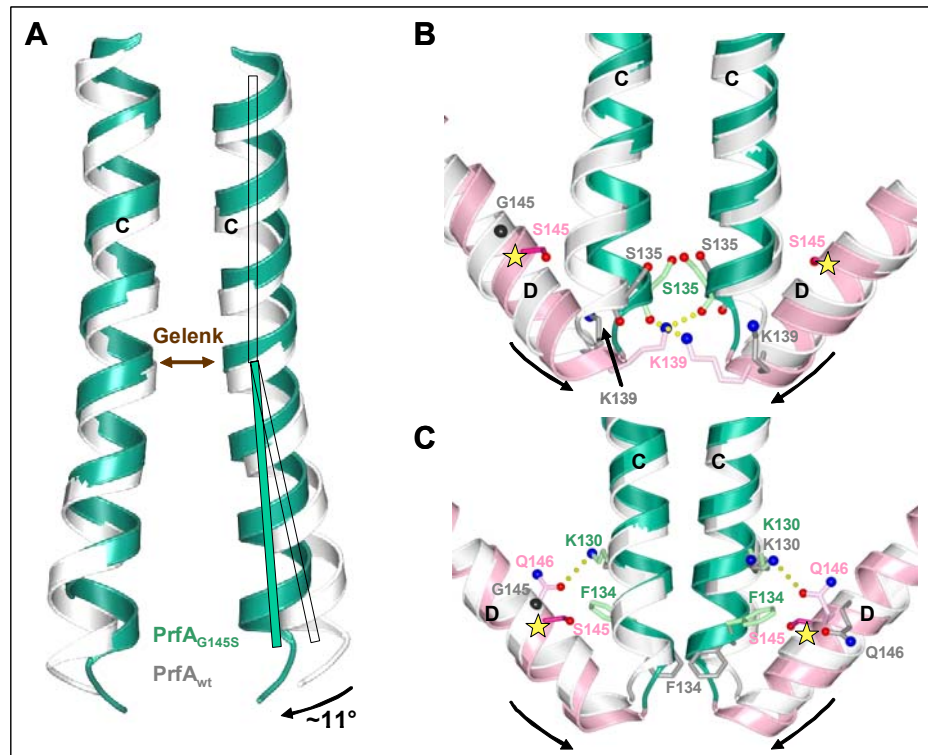


Abbildung 17: Konformationsänderungen im Bereich der α -Helices α C und α D als Folge der Mutation.

PrfA_{G145S} ist in den bereits verwendeten Farben wie in Abbildung 14 und PrfA_{wt} in hellgrau dargestellt. A) Die Mutation G145S forciert die Begradigung der Helix α C in PrfA_{G145S} um $\sim 11^\circ$; B) Kugel-Stab-(ball-and-stick)-Darstellung von Aminosäuren im Schlaufenbereich α C- α D, die aufgrund der Mutation eine veränderte Konformation einnehmen. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelbe, gepunktete Linien dargestellt; C) ball-and-stick-Darstellung von Aminosäuren im Mutationsbereich, die aufgrund der Mutation konformelle Änderungen einnehmen. Die Mutationsstelle ist durch einen gelben Stern gekennzeichnet.

Einfluss der G145S Mutation auf die Konformation des HTH-Motivs

Die dramatischste Veränderung als Folge der Mutation G145S ist eine grundlegende Neuorientierung des HTH-Motivs. Während die Schlaufe α E- α F in PrfA_{wt} fehlgeordnet ist, ist α E- α F in PrfA_{G145S} stabilisiert, so dass in 6 von 8 Monomeren eine gut definierte Elektronendichte in diesem Bereich erkennbar ist. Obwohl die PrfA_{wt}-Struktur von Thirumuruhan *et al.* (2003) in einer anderen Kristallpackung vorliegt, ist auch hier α E- α F fehlgeordnet. Nach eingehender Kristallpackungsanalyse kann davon ausgegangen werden, dass die gut definierte Schlaufe α E- α F in PrfA_{G145S} kein kristallographisches Packungsartefakt ist, sondern eine indirekte Folge der Mutation.

In PrfA_{G145S} ist nicht nur die Schlaufe α E- α F stabilisiert, sondern auch α E und α F anders orientiert: während bei PrfA_{wt} α E bereits bei Aminosäure 168 beginnt und sich bis Aminosäure 170 erstreckt, bilden bei PrfA_{G145S} die Aminosäuren 171-177 die α -Helix α E aus. Die Schlaufe β 10- α E ist in PrfA_{G145S} demzufolge um drei Aminosäuren länger, wodurch sich α E in Richtung der Dimer-Grenzfläche verschiebt. Die Schlaufe α E- α F wird gleichzeitig um drei Aminosäuren verkürzt. Die DNA-Erkennungshelix (α F) des HTH-Motivs ist in PrfA_{G145S} stärker gebogen als α F von PrfA_{wt} (nicht gezeigt), so dass sich die Entfernung zwischen α F und α F* der beiden Monomere in PrfA_{G145S} verkürzt. Die strukturellen Veränderungen in PrfA_{G145S} führen möglicherweise dazu, dass α F besser in die große Furche der DNA passt.

2.1.9 Wie induziert die Mutation die strukturellen Veränderungen im HTH-Motiv?

Die Mutation G145S befindet sich zentral in α D und ist nicht in unmittelbarer Nähe zum HTH-Motiv lokalisiert. Wie kann dieser Aminosäureaustausch folglich eine strukturelle Änderung im HTH-Motiv auslösen?

Die Stabilisierung des HTH-Motivs in PrfA_{G145S} scheint direkt mit der Verlagerung von α C und α D zusammenzuhängen. Die Mutation verschiebt α D entlang der helikalen Achse, wodurch der Knick in α C aufgehoben wird. Die dabei entstandene hydrophobe Tasche zwischen α C und α D wird durch ein Hereinschwenken von Phe134 (α C) stabilisiert. Phe134 (α C) bildet dabei nicht nur van-der-Waals-Kontakte zu Ser145 in α -Helix α D aus, sondern auch zu Ser178, das in der Schlaufe α E- α F lokalisiert ist. Aufgrund der Begradigung von α C bildet Lys139 (α D) ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zu Ser135 in α C und zu Gly179-O aus, das in der Schlaufe α E- α F lokalisiert ist. Die Methylengruppen in der Seitenkette von Lys139 bilden gleichzeitig hydrophobe Kontakte zu Ile180 (α E- α F) aus. Daraus folgt, dass Konformationsänderungen zwischen α C und α D in PrfA_{G145S} einen direkten Einfluss auf die Schlaufe α E- α F ausüben. Lys139 (α D) und Phe134 (α C) sind dabei entscheidend bei der Übertragung der strukturellen Änderungen auf das HTH-Motiv. Die im Vergleich zu PrfA_{wt} neu gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Kontakte in PrfA_{G145S} sind in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

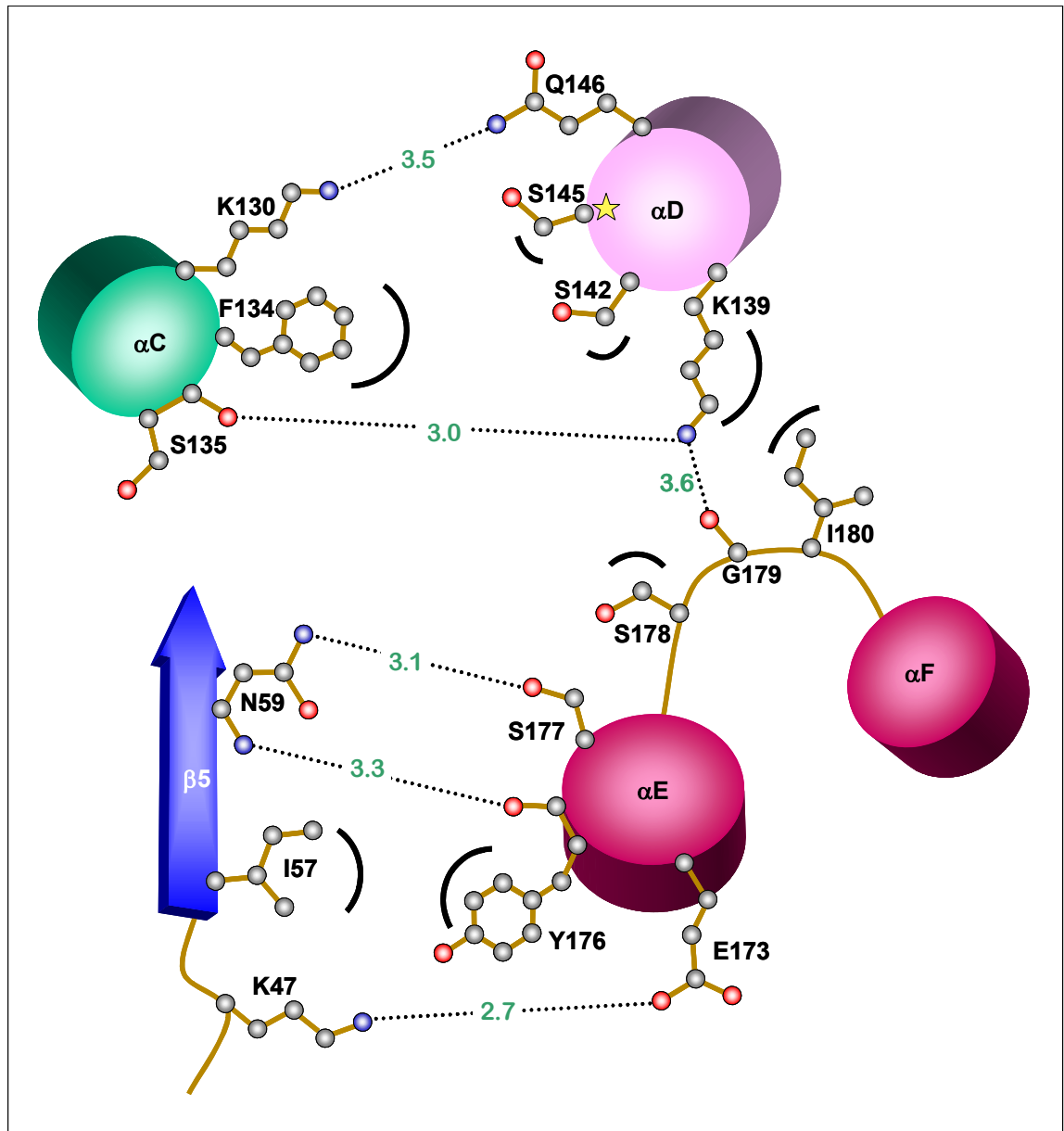


Abbildung 18: Schematische Darstellung der durch die Mutation neu entstandenen Kontakte in PrfA_{G145S}.

Die Zylinder repräsentieren α -Helices, während der Pfeil den β -Strang darstellt. Die Farben entsprechen den bereits verwendeten Farben wie in Abbildung 14. Der gelbe Stern markiert die Mutationsstelle. Schwarze Bögen stellen hydrophobe Kontakte und gepunktete Linien Wasserstoffbrücken dar.

Neben den α -Helices α C und α D nimmt auch ein β -Strang der N-terminalen Domäne Einfluss auf die Struktur des HTH-Motivs. Der β -Strang β 5 in PrfA_{G145S} ist im Vergleich zu PrfA_{wt} lateral in Richtung α E verschoben. Dabei entstehen Wasserstoffbrückenbindungen zu α E, unter anderem Asn59-N_{δ2} (β 5) zu Ser177-O_γ (α E) und Asn59-N (β 5) zu Tyr176-O (α E). Darüberhinaus werden eine Salzbrücke zwischen Lys47-N_ζ (β 4- β 5) und Glu173-O_δ (α E) sowie ein hydrophober Kontakt zwischen I57 (β 5) und Tyr176 (α E) gebildet. Diese neuen Wechselwirkungen in PrfA_{G145S}, verursacht durch die Bewegung von β 5, stabilisieren die neue Position von α E des HTH-Motivs.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure (Gly145→Ser) in PrfA umfassende strukturelle Änderungen hervorruft, die insbesondere die α -Helices α D und α C betreffen. Dies führt indirekt zu einer Neuorientierung von α -Helix α E sowie zu einer Stabilisierung des HTH-Motivs. Weitere signifikante Änderungen zwischen PrfA_{wt} und PrfA_{G145S} betreffen die Schleife β 4- β 5 sowie die Dimer-Grenzfläche.

2.2 PrfA-DNA-Interaktionsstudien

2.2.1 Untersuchung der PrfA-DNA-Interaktion mittels EMSA

Die Erkennung spezifischer DNA-Sequenzen durch PrfA ist entscheidend für die Regulation der Virulenzfaktorexpression in *Listeria monocytogenes*. Die Wechselwirkung von rekombinantem PrfA mit DNA sollte zunächst mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) untersucht werden. Das Prinzip des EMSA beruht auf der Tatsache, dass die spezifische Bindung eines Proteins an einer DNA-Sequenz dessen Mobilität in einem nicht-reduzierenden Polyacrylamid-Gel verringert und dadurch eine Verschiebung der DNA-Bande gegenüber der Protein-freien DNA verursacht, die mittels Autoradiographie detektiert werden kann. Für die Untersuchung der PrfA-DNA-Bindung mit Hilfe des EMSA wurde in dieser Arbeit ein 28 bp langes, doppelsträngiges Oligonukleotid verwendet, das die PrfA-Box des *hly*-Promotors enthält.

In Spur 1 der Abbildung 19 ist radioaktiv markiertes Oligonukleotid in Abwesenheit von PrfA als Kontrolle aufgetragen. Statt einer definierten Oligonukleotid-Bande ist diese aufgrund der Wanderung in einer Gelmatrix stark nach oben und unten ausgedehnt. Nach Zugabe von 0.5 µg PrfA zur DNA ist eine zusätzliche, ebenfalls ausgedehnte Bande im oberen Bereich des Gels zu erkennen (Spur 2), deren verringerte Mobilität auf die Erkennung der DNA durch PrfA zurückzuführen ist.

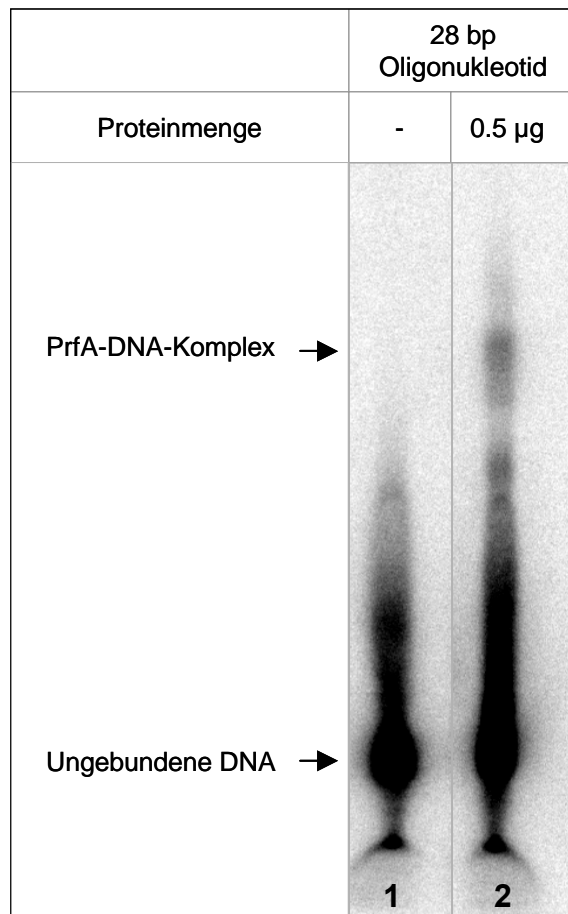


Abbildung 19: EMSA zur Untersuchung der PrfA-Bindung an ein 28 bp langes Oligonukleotid.

Auftrag von radioaktiv markierter DNA (Spur 1) und 0.5 µg PrfA mit radioaktiv markierter DNA (Spur 2) auf ein 5 %iges nicht-reduzierendes Polyacrylamid-Gel. Expositionsdauer = 1 Tag.

Da zahlreiche Faktoren Einfluss auf das Laufverhalten sowie auf die Bandenintensität nehmen, wurde versucht, durch Veränderung des pH-Wertes, der Ionenstärke des Elektrophoresepuffers sowie durch verschiedene Konzentrationen der Gelmatrix eine definiertere DNA-Bande im Gel zu erzeugen. Durch Veränderung der Zusammensetzung des Protein-DNA-Bindepuffers und des stöchiometrischen Verhältnisses zwischen PrfA und DNA sollte eine klar definierte Komplex-Bande entstehen. Ausgiebige Modifikationen der einzelnen Faktoren vermochten jedoch keine schärfere DNA-Bande oder definiertere PrfA-DNA-Bande zu erzeugen. Die Bindung von PrfA an DNA konnte zwar mit EMSA qualitativ nachgewiesen werden, doch erwies sich diese Methode auch im Hinblick auf eine quantitative Bestimmung der Bindungsaffinität als nicht geeignet.

2.2.2 Untersuchung der PrfA-DNA-Interaktion mittels Gelfiltration

Eine weitere Methode zur Untersuchung der PrfA-DNA-Interaktion ist die Gelfiltration, bei der Moleküle aufgrund ihrer Größenunterschiede getrennt werden.

Für die Komplexbildung wurde PrfA mit einem 28 bp langen, doppelsträngigen Oligonukleotid, das die Sequenz des *hly*-Promotors umfasst, in einem molaren Verhältnis von 2:1 vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Um zwischen dem Protein-DNA-Komplex und unkomplexierten Protein bzw. unkomplexierter DNA unterscheiden zu können, wurde zunächst sowohl für PrfA als auch für das Oligonukleotid das jeweilige Elutionsvolumen mit einer Superdex 200 10/30 ermittelt. Unkomplexiertes PrfA eluierte bei einem Elutionsvolumen von $V_E = 15.6$ mL (Abbildung 20, schwarze Linie, kariert Bereich), während unkomplexierte 28 bp lange DNA bereits nach $V_E = 14.9$ mL eluierte (rote Linie, längsgestreifter Bereich). Die Differenz der Elutionsmaxima zwischen diesen beiden Komponenten war nicht sehr groß, aber sichtbar. Weiterhin konnte gut zwischen dem DNA- und dem Protein-Peak unterschieden werden, da DNA bei 260 nm und Protein bei 280 nm eine höhere Absorption aufweisen.

Abbildung 20 zeigt die Überlagerung der Elutionsprofile des unkomplexierten PrfA, der unkomplexierten DNA sowie des PrfA-DNA-Komplexes bei einer Stöchiometrie von 2:1 (PrfA:DNA). Bei der Detektionswellenlänge von 260 nm (orange Linie) ist deutlich zu erkennen, dass der PrfA-DNA-Komplex bis zu 1 mL früher eluiert als unkomplexierte DNA (gepunkteter Bereich).

Diesem Elutionsmaximum angelagert sind jedoch zwei Schultern bei $V_E = 14.8$ mL und $V_E = 15.4$ mL. Bei $A_{280\text{nm}}$ (hellblau) ist letztere als zweites Maximum bei $V_E = 15.5$ mL zu erkennen. Diese Absorptionsschultern sind auf unkomplexierte DNA bzw. unkomplexiertes PrfA zurückzuführen und deuten darauf hin, dass die Komplexbildung nicht vollständig ist. Durch den Einsatz eines molaren Verhältnisses von 1:1 (PrfA:DNA) (nicht gezeigt) konnte zwar das Elutionsmaximum des freien PrfA reduziert werden, doch die auf freie DNA zurückzuführende Schulter wurde etwas größer.

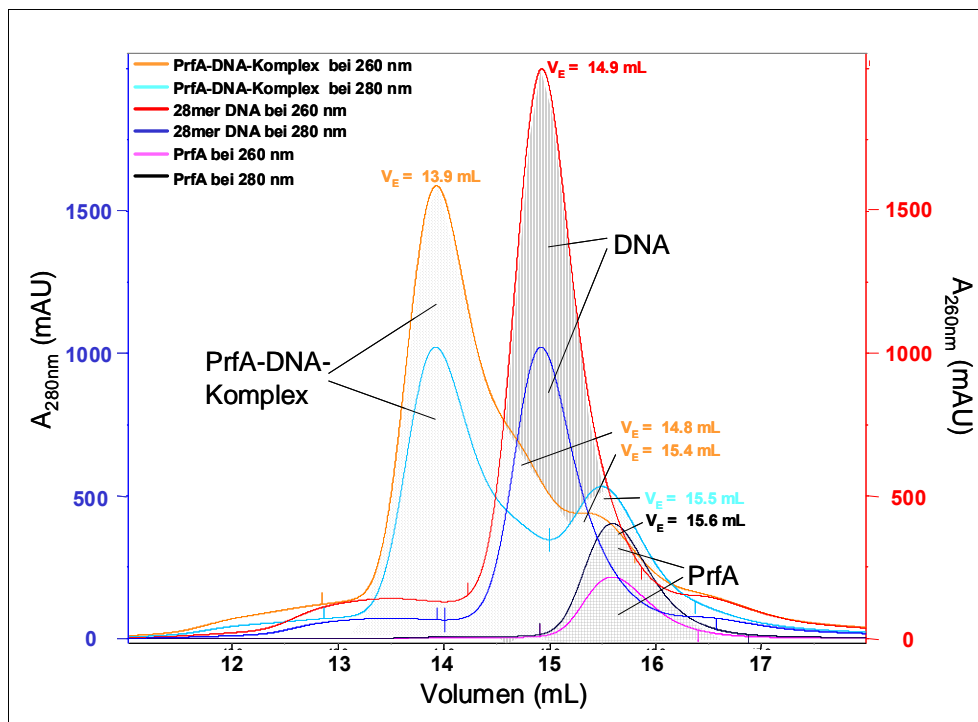


Abbildung 20: Gelfiltrationschromatogramm eines PrfA-DNA-Komplexes.

Getrennte Gelfiltrationsläufe einer Superdex 200 10/30 wurden in einem Chromatogramm überlagert und verglichen. Unkomplexiertes PrfA ist als rosa Linie bei A_{260nm} und als schwarze Linie bei A_{280nm} dargestellt. Unkomplexierte 28 bp lange, doppelsträngige DNA ist bei A_{260nm} als rote Linie und bei A_{280nm} als dunkelblaue Linie gekennzeichnet. Der PrfA-DNA-Komplex wurde in einem molaren Verhältnis von 2:1 (PrfA:DNA) aufgetragen. Die orange Linie kennzeichnet die A_{260nm} und die hellblaue Linie die A_{280nm}. V_E = Elutionsvolumen.

Auch durch die Verwendung anderer Säulenmaterialien konnte keine schärfere Trennung des PrfA-DNA-Komplexes von den angelagerten Schulter-Komponenten erzielt werden. Die Gewinnung einer sauberen Komplexfraktion mittels Gelfiltration ist demnach nicht möglich.

Die Komplexierung von PrfA mit DNA wurde weiterhin mit unterschiedlichen Oligonukleotidlängen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass PrfA stabil an Oligonukleotide ab einer Länge von 16 bp bindet. Die Trennschärfe der Gelfiltration konnte dadurch jedoch nicht weiter gesteigert werden.

2.2.3 Untersuchung der PrfA-DNA-Interaktion mittels SPR

Die Wechselwirkung von Proteinen mit DNA lässt sich in Echtzeit und innerhalb kürzester Zeit mittels SPR (Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie) verfolgen. Die dafür benötigten Proteinmengen sind im Gegensatz zur Gelfiltration sehr gering. Zusätzlich lässt sich aus den gemessenen Bindungsreaktionen zwischen PrfA und DNA die Bindungsaffinität bestimmen.

Für die Analyse der Wechselwirkung von PrfA_{wt} mit DNA wurde ein 28 bp langes, biotinyliertes Oligonukleotid, das die PrfA-Box des *hly*-Promotors enthält, mit dem BIAcore-System auf einen Streptavidin-Chip gekoppelt. SPR-Versuche mit PrfA_{G145S} wurden in der Diplomarbeit von Gregor Hagelücken mit dem gleichen SA-Chip und den gleichen Pufferbedingungen ausgeführt, so dass die Ergebnisse miteinander vergleichbar waren (Hagelücken, 2004). Gereinigtes PrfA wurde für die Bindungsstudien in jeweils ansteigenden Konzentrationen von 0.016 - 5.0 μ M in BIAcore-Puffer II eingesetzt. Die Messungen erfolgten bei einer Flussrate von 10 μ L/min. Für die Auswertung wurden die Resonanzsignale in Resonanzeinheiten (RU) durch Subtraktion der Referenzzelle von unspezifischen Signalen korrigiert und alle Messungen einer Messreihe auf eine Basislinie normalisiert. Das Sensorgramm einer Messreihe ist in Abbildung 21 dokumentiert.

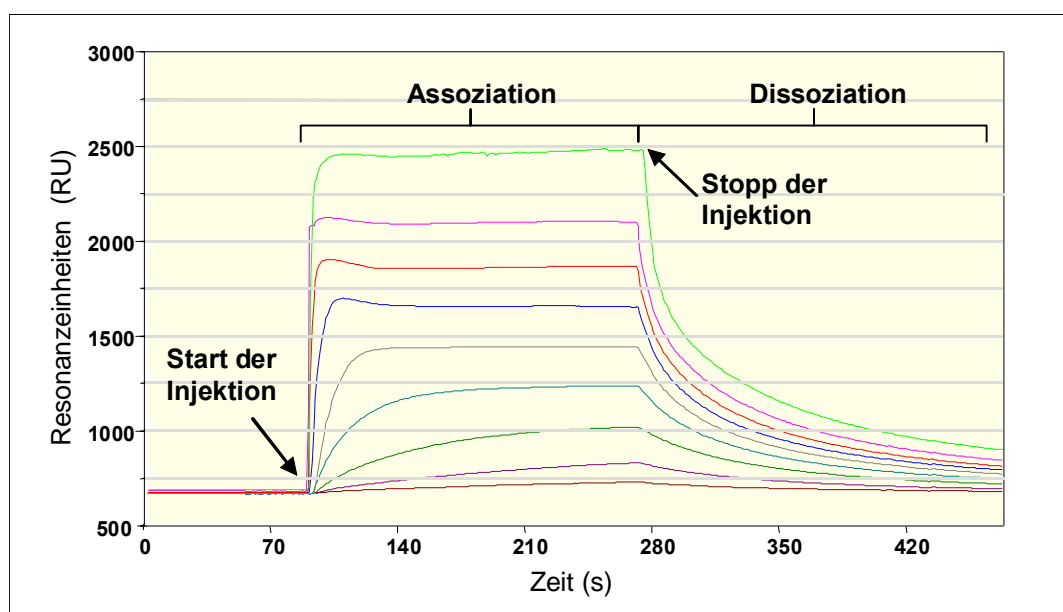


Abbildung 21: Sensorgramm einer PrfA_{wt}-Messreihe.

Proben verschiedener PrfA_{wt}-Konzentrationen wurden nacheinander über den mit Oligonukleotid-beschichteten SA-Chip gegeben. Die erhaltenen Sensorgramme sind in unterschiedlichen Farben dargestellt (grün = 5.00 μ M PrfA bis braun = 0.02 μ M PrfA, mit 2 fachen Verdünnungsschritten). Gekennzeichnet ist der Zeitpunkt der Injektion von PrfA, die Assoziationsphase während der PrfA an den Chip bindet, sowie der Injektionsstopp, der durch Puffer-Zugabe eingeleitet wird und die darauf folgende Dissoziationsphase.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden alle Versuche dreifach wiederholt, um statistisch relevante Durchschnittswerte berechnen zu können. Das Resonanzsignal im Gleichgewicht der Reaktionen (RU_{eq}) wurde gegen die jeweilige Konzentration des Proteins aufgetragen (Abbildung 22). Diese Werte wurden mittels nicht-linearer Regression (gestrichelte Linien) und der

Gleichung $RU_{eq} = \frac{R_{max} \cdot [PrfA]}{K_D + [PrfA]} + [PrfA] \cdot N$ ausgewertet, um neben anderen

Parametern der Langmuir-Bindungsisotherme die Dissoziationskonstante zu ermitteln. Aufgrund unspezifischer Bindung von PrfA an den mit Oligonukleotid-beschichteten Chip (möglicherweise an Haarnadelschlaufen-Bereiche der Oligonukleotide oder einzelsträngige Bereiche), musste der Term $[PrfA] \cdot N$ in die Berechnung miteinbezogen werden. Bei Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Regressionskurve, ergibt sich die theoretisch berechnete, spezifische Bindungsisotherme (kontinuierliche Linien). Dabei nähern sich diese Kurven asymptotisch einem R_{max} -Wert, der für $PrfA_{wt}$ und $PrfA_{G145S}$ aufgrund der gleichen Anzahl der Bindungsplätze auf dem Chip ähnlich ist.

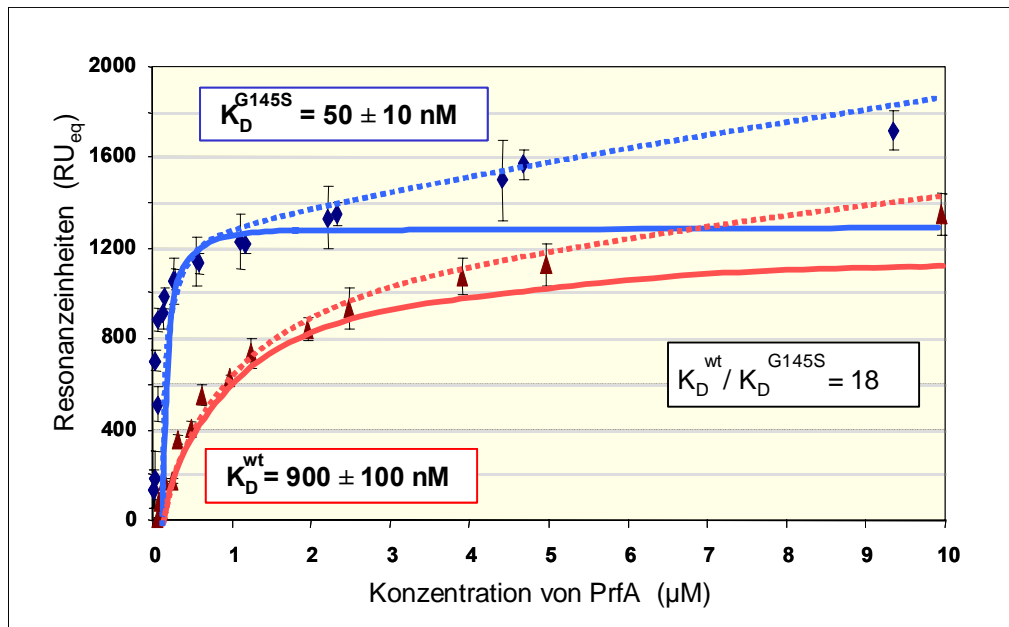


Abbildung 22: Bindungsisotherme der $PrfA_{wt}$ (rot, ▲)/ $PrfA_{G145S}$ (blau, ◆)-DNA-Interaktion.

Das Resonanzsignal im Gleichgewicht der Bindungsreaktion (RU_{eq}) ist gegen die $PrfA$ -Konzentration aufgetragen. Der Durchschnittswert und die dazugehörige Standardabweichung für jeden Punkt sind dargestellt. Die Bindungsisotherme für eine spezifische $PrfA$ -DNA-Bindung (kontinuierliche Linie) wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung (nicht gezeigt) von der experimentell ermittelten Bindung (gestrichelte Linie) ermittelt. Die R_{max} -Werte für beide Proteine sind annähernd gleich: 1240 ± 40 RU ($PrfA_{G145S}$) und 1183 ± 60 RU ($PrfA_{wt}$). Die Dissoziationskonstante für $PrfA_{wt}$ ist $9 \cdot 10^{-7} \pm 1 \cdot 10^{-7}$ M und für $PrfA_{G145S}$ $5 \cdot 10^{-8} \pm 1 \cdot 10^{-8}$ M.

Durch die $PrfA$ -DNA-Bindungsstudie mit dem BIAcore-System konnten Dissoziationskonstanten (K_D) für $PrfA$ ermittelt werden. $PrfA_{G145S}$ bindet 18 x stärker an den *hly*-Promotor ($K_D = 50 \pm 10$ nM) als $PrfA_{wt}$ ($K_D = 900 \pm 100$ nM). Für $PrfA_{wt}$ wurde in früheren Studien eine ähnliche Dissoziations-

konstante von 200 nM mit Hilfe von EMSA geschätzt (Sheehan *et al.*, 1996). Für PrfA_{G145S} wurden zu dieser Arbeit vergleichbar höhere DNA-Bindungsaffinitäten festgestellt. In *in vitro*-Transkriptionsversuchen zeigte PrfA_{G145S} eine 2-16 fach stärkere DNA-Bindung im Vergleich zu PrfA_{wt} (Vega *et al.*, 2004). *Footprinting*-Studien zeigten eine 7 fach stärkere Bindung von PrfA_{G145S} an DNA (Vega *et al.*, 1998).

2.2.4 Kokristallisation von PrfA mit Oligonukleotiden

Die spezifische Erkennung bestimmter DNA-Sequenzen durch Proteine ist bei vielen Prozessen wie der Genregulation und Transkription von elementarer Bedeutung. Die Spezifität der Bindung beruht auf atomarer Ebene auf der Interaktion bestimmter Seitenketten des Proteins mit Nukleotiden der DNA. Zur detaillierten Analyse der Wechselwirkung von PrfA mit seiner DNA-Erkennungssequenz, der PrfA-Box, sollte die Kristallstruktur eines PrfA-DNA-Komplexes röntgenkristallographisch gelöst werden. Erfolgreiche Kristallisationsstudien verschiedenster Protein-DNA Komplexe zeigen, dass die Länge der Oligonukleotide und die Art der Überhänge kritische Variablen für das Kristallwachstum sind (Tan *et al.*, 2000). Im Kristall ist eine pseudo-unendliche DNA-Helix besonders günstig. Dabei greift das überhängende Ende eines doppelsträngigen Oligonukleotides den komplementierenden Anfang des nächsten Oligonukleotides (*end-to-end stacking*) (Joachimiak & Sigler, 1991).

Zunächst wurden Kokristallisationsansätze von PrfA mit Oligonukleotiden vorgenommen, die mit sich selbst hybridisieren und demnach genau palindromisch sind. Das kürzeste Oligonukleotid enthielt 14 Basenpaare, die in leicht abgewandelter Form der PrfA-Box des *hly*-Promotors entsprechen (roter Bereich in Abbildung 23): in der Mitte der Sequenz wurden nicht zwei Thymidine, sondern ein Thymidin und ein Adenosin gewählt. Diese beiden Basen scheinen unkritisch bei der Sequenzspezifität von PrfA zu sein (Freitag *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 2000) und wurden für die Kristallisation daher so gewählt, dass perfekt palindromische Oligonukleotide erhalten wurden. Da die Länge der Oligonukleotide eine wichtige Rolle bei der Kristallisation spielt, wurden diese 14 Basenpaare systematisch um 1 Base verlängert, so dass insgesamt 24 Oligonukleotide mit ansteigender Basenanzahl resultierten. Diese Oligonukleotide enthielten entweder 1 bis 2 Basen als Überhänge oder hatten

stumpfe Enden (Abbildung 23). Maximal 30 Basenpaare bildeten ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit einer 5'-Überhangbase (Tabelle 5).

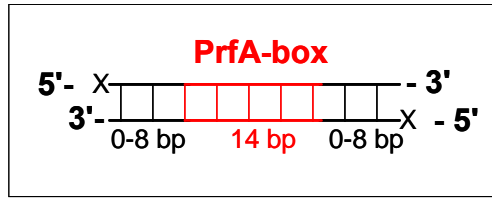


Abbildung 23: Schematische Darstellung der eingesetzten Oligonukleotide für Kokristallisationsversuche.

Aufbau der perfekt palindromischen und doppelsträngigen Oligonukleotide mit 5'-Überhängen. Die PrfA-Box ist in rot gekennzeichnet. Für den 5'-Überhang wurden verschiedene Basen eingesetzt (X = T, C, G, TA oder CG). Die eingesetzten Oligonukleotide waren demnach mindestens 14 bp und maximal 32 bp lang.

Vorteil der Verwendung dieser Oligonukleotide war, dass bei der Hybridisierung nur eine Art von Doppelstrang gebildet wird und dass durch Hoogsteen-Basenpaarung ein Ineinandergreifen der Oligonukleotide ermöglicht werden kann (Patikoglou *et al.*, 1999).

Tabelle 5: Kokristallisationsansätze von PrfA mit perfekt palindromischer DNA. Die PrfA-Box ist in rot hervorgehoben.

Nr.	Länge/ Überhang	Oligo-Name	Sequenz (5' → 3')
1	14 bp	14B	<u>TTAACATATGTTAA</u> <u>AATTGTATACAATT</u>
2	16 bp/ 5'-A	14A	A <u>TTAACATATGTTAA</u> <u>AATTGTATACAATT</u> A
3	18 bp/ 5'-G	14G	GC <u>TTAACATATGTTAA</u> G G <u>AATTGTATACAATT</u> CG
4	16 bp/ 5'-G	14G2	G <u>TTAACATATGTTAA</u> <u>AATTGTATACAATT</u> G
5	16 bp/ 5'-C	14C	C <u>TTAACATATGTTAA</u> <u>AATTGTATACAATT</u> C
6	16 bp/ 5'-T	14T	T <u>TTAACATATGTTAA</u> <u>AATTGTATACAATT</u> T
7	18 bp/ 5'-TA	14TA	TA <u>TTAACATATGTTAA</u> <u>AATTGTATACAATT</u> AT
8	18 bp/ 5'-CG	14CG	CG <u>TTAACATATGTTAA</u> <u>AATTGTATACAATT</u> GC
9	18 bp/ 5'-A	16A	AA <u>TTAACATATGTTAA</u> T T <u>AATTGTATACAATT</u> AA
10	18 bp/ 5'-T	16T	TA <u>TTAACATATGTTAA</u> T T <u>AATTGTATACAATT</u> AT
11	20 bp/ 5'-C	18C	CCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TG GT <u>AATTGTATACAATT</u> ACC
12	20 bp/ 5'-G	18G	GCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TG GT <u>AATTGTATACAATT</u> ACG
13	22 bp/ 5'-C	20C	CGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGC CGT <u>AATTGTATACAATT</u> ACGC
14	22 bp/ 5'-G	20G	GGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGC

			CGT AATTGTATACAATT ACGG
15	24 bp/ 5'-C	22C	CGGCA TTAACATATGTTAA TGCC CCGT AATTGTATACAATT ACGGC
16	24 bp/ 5'-G	22G	GGGCA TTAACATATGTTAA TGCC CCGT AATTGTATACAATT ACGGG
17	26 bp/ 5'-A	24A	AAGGCA TTAACATATGTTAA TGCCT TCCGT AATTGTATACAATT ACGGAA
18	26 bp/ 5'-T	24T	TAGGCA TTAACATATGTTAA TGCCT TCCGT AATTGTATACAATT ACGGAT
19	28 bp/ 5'-C	26C	CGAGGCA TTAACATATGTTAA TGCCTC CTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGC
20	28 bp/ 5'-g	26G	GGAGGCA TTAACATATGTTAA TGCCTC CTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGG
21	30 bp/ 5'-A	28A	ATGAGGCA TTAACATATGTTAA TGCCTCA ACTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGTA
22	30 bp/ 5'-T	28T	TTGAGGCA TTAACATATGTTAA TGCCTCA ACTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGTT
23	32 bp/ 5'-C	30C	CCTGAGGCA TTAACATATGTTAA TGCCTCAG GACTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGTCC
24	32 bp/ 5'-G	30G	GCTGAGGCA TTAACATATGTTAA TGCCTCAG GACTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGTCG

Zusätzlich zu der oben beschriebenen Kristallisationsstrategie mit perfekt palindromischen DNA-Sequenzen wurde eine zweite Strategie, modifiziert nach Schultz et al. (1990), angewandt. Hierbei werden zwei verschiedene, nicht-palindromische Oligonukleotide (*half-site* Oligonukleotide) konzipiert (Abbildung 24). Das eine Oligonukleotid ist am 3'-Ende in vier Basen komplementär (grüner Oligonukleotid-Strang und rot schraffierte Fläche), während das zweite Oligonukleotid komplementär zum 5'-Ende des ersten Oligonukleotids ist (blauer Oligonukleotid-Strang). Diese *half-site* Oligonukleotide werden miteinander hybridisiert, so dass sie gemeinsam die PrfA-Box bilden.

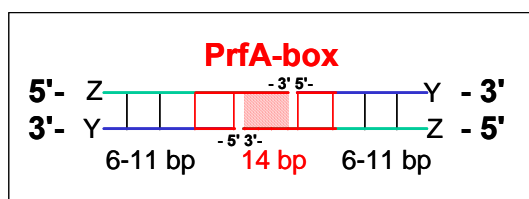


Abbildung 24: Schematische Darstellung der eingesetzten Oligonukleotide nach Schultz *et al.* (1990).

Zwei verschiedene Oligonukleotide bilden zusammen die PrfA-Box (rot). Die Lücke zwischen diesen beiden Oligonukleotiden resultiert aus einer nicht gebildeten Phosphodiesterbindung. Das Oligonukleotid mit dem Z-Überhang ist am 3'-Ende in vier Basen komplementär (rot schraffierte Fläche). Das andere Oligonukleotid (blau) ist zu dem 5'-Ende des jeweils anderen Oligonukleotids (grün) komplementär. Für Z und Y wurden folgende Basen eingesetzt: C, CG, G oder GC.

Die Oligonukleotidkonstruktion nach Schultz *et al.* (1990) erlaubt ein kostengünstigeres Untersuchen von DNA-Fragmenten für Kokristallisations-

versuche, da mit einer geringeren Anzahl von Oligonukleotiden eine größere Auswahl in Länge und Art der Überhänge der Oligonukleotide erzielt werden kann. Die Benutzung von *half-site* Oligonukleotiden vermeidet zudem die Haarnadelschleifen-Bildung, die bei palindromischen Sequenzen auftreten kann. Mit dieser zweiten Strategie wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 26 bp - 40 bp mit stumpfen Enden oder 5'- bzw. 3'-Überhänge von 1 bis 2 Basen für Kokristallisationsversuche verwendet (Tabelle 6).

Bei den meisten Protein-DNA-Kokristallisationsansätzen wurde ein Überschuss an DNA verwendet (Joachimiak & Sigler, 1991). Daher wurde in dieser Arbeit für alle Kokristallisationen von PrfA mit DNA ein molares Verhältnis von 1:1.2 (Protein:DNA) eingesetzt. Die Kokristallisationsversuche wurden sowohl mit PrfA_{wt} als auch mit PrfA_{G145S} durchgeführt. Als Screening-Kit wurde der *Natrix-Screen* von Hampton Research verwendet, dessen Bedingungen speziell für Protein-DNA-Kristallisationen optimiert wurden. Als Kontrolle wurden parallel alle Ansätze mit PrfA ohne DNA angesetzt, um die Bedingungen auszuschließen, bei denen PrfA trotz Anwesenheit von DNA auch alleine kristallisiert.

Tabelle 6: Kokristallisationsansätze mit Oligonukleotidkonstruktionen nach Schultz *et al.* (1990). PrfA-Box ist in rot hervorgehoben.

Nr.	Länge/ Überhang	Oligo- Name	Sequenz (5' → 3')
25	26 bp	15_11	GAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTC CTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAG
26	28 bp/ 3'-G	15_12	GAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTC G GCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAG
27	30 bp/ 3'-CG	15_13	GAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTC CG CGCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAG
28	28 bp	16_12	CGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTCG GCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGC
29	30 bp/ 3'-C	16_13	CGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTC CG CGCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGC
30	32 bp/ 3'-GC	16_14	CGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTC CGCG GCGCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGC
31	28 bp/ 5'-C	16_11	CGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTC CTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGC
32	30 bp/ 5'-GC	17_11	GCGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTC CTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGC G
33	30 bp/ 5'-G	17_12	GCGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTCG GCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGC G
34	30 bp	17_13	GCGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGC CGCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGCG
35	32 bp/ 3'-G	17_14	GCGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGC G GCGCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGCG
36	34 bp/ 3'-CG	17_15b	GCGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGC CG CGCGCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGCG
37	32 bp/ 5'-CG	18_12	CGCGAGGCA TTAACATATGTTAAT GCCTCG GCTCCGT AATTGTATACAATT ACGGAGC CG

Ergebnisse

38	32 bp/ 5'-C	18_13	CGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGC CGCTCCGTAAATTGTATACAATT ACGGAGCGC
39	32 bp	18_14	CGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGC
40	34 bp/ 3'-C	18_15b	CGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCG CGCGCTCCGTAAATTGTATACAATT ACGGAGCGC
41	34 bp/ 5'-GC	19_13	GCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCG CG
42	34 bp/ 5'-G	19_14	GCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCG CG
43	34 bp	19_15b	GCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGCG
44	34 bp/ 3'-GC	18_16b	CGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCG CG GCGCGCTCCGTAAATTGTATACAATT ACGGAGCGC
45	34 bp/ 3'-G	19_16b	GCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCG CG GCGCGCTCCGTAAATTGTATACAATT ACGGAGCGCG
46	34 bp/ 3'-CG	19_17b	GCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCG CG CGCGCTCCGTAAATTGTATACAATT ACGGAGCGCG
47	35 bp/ 5'-C	20_15b	CGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCG CGCG
48	34 bp/ 5'-CG	20_14	CGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCG CGCG
49	36 bp	20_16b	CGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGCGC
50	37 bp/ 3'-C	20_17b	CGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCG CG CGCGCTCCGTAAATTGTATACAATT ACGGAGCGCGC
51	38 bp/ 3'-GC	20_18b	CGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCG CG GCGCGCTCCGTAAATTGTATACAATT ACGGAGCGCGC
52	38 bp	21_17b	GCGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGCGCG
53	37 bp/ 5'-G	21_16b	GCGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGCG CG
54	36 bp/ 5'-GC	21_15b	GCGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGCG CG
55	39 bp/ 3'-G	21_18b	GCGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCG CG GCGCGCTCCGTAAATTGTATACAATT ACGGAGCGCGCG
56	40 bp	22_18b	CGCGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGCGGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGCGCGC
57	39 bp/ 5'-C	22_17b	CGCGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGCG CGCG
58	38 bp/ 5'-CG	22_16b	CGCGCGCGAGGCCA TTAACATATGTTAAT GCCTCGCGCGGCGCTCCGT AAATTGTATACAATT ACGGAGCGCG CGCG

Von den 48 Kristallisationsansätzen mit perfekt palindromischen Oligonukleotiden mit PrfA_{wt} und PrfA_{G145S} ergaben 8 Ansätze Kristalle, während von den 68 Ansätzen mit *half-site* Oligonukleotiden 13 Ansätze Kristalle ergaben.

Die meisten Kristalle streuten die Röntgenstrahlung trotz intensiver Optimierungsversuche sehr schlecht (Auflösung ≥ 9 Å) oder gar nicht und zeigten im Beugungsbild oftmals keine, nur vereinzelte oder stark verschmierte Reflexe. Es wurden jedoch drei größere Kristalle mit den Oligonukleotiden 14T, 16T und 15b_17 erhalten (Abbildung 25), die wesentlich bessere Beugungen zeigten. Das Oligonukleotid 14T kristallisierte mit PrfA_{wt} unter der Kristallisationsbedingung 0.04 M MgCl₂, 0.05 M NaCacodylat pH 6.0 und 5 %

(w/v) MPD (stäbchenförmige Kristalle). Die Mutante PrfA_{G145S} zeigte mit dem Oligonukleotid 16T ebenfalls stäbchenförmige Kristalle unter der Bedingung 0.01 M MgCl₂, 0.05 M Ammoniumacetat, 0.05 M Tris-HCl pH 7.5 und 10 % (w/v) MPD. Hexagonale Kristalle wurden mit dem Oligonukleotid 15b_17 und PrfA_{wt} unter der Bedingung 0.05 M Hepes pH 7, 0.1 M KCl, 0.01 M CaCl₂ und 10 % (w/v) PEG 400 erhalten. Diese Kristalle wurden am Synchrotron (Beamline BW6 und X11, DESY, Hamburg) vermessen und ergaben Beugungsbilder, die erfolgreich indiziert werden konnten (Tabelle 7).

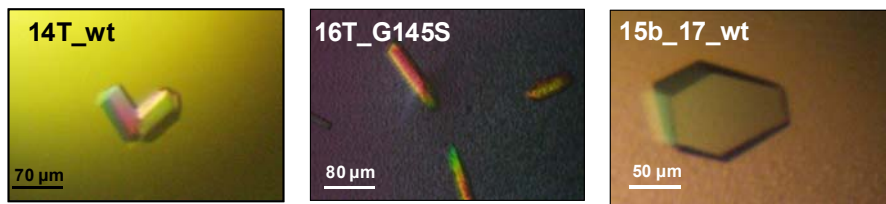


Abbildung 25: PrfA-DNA-Kristalle.

Für die Kokristallisation wurde PrfA mit DNA in einem molaren Verhältnis von 1:1.2 versetzt und nach der Methode des hängenden Tropfens bei 20°C durchgeführt. Die Kristallisationsbedingung für PrfA_{wt} mit 14T-Oligonukleotid ist: 0.04 M MgCl₂, 0.05 M NaCacodylat pH 6.0 und 5 % (w/v) MPD. Die Kristallisationsbedingung für PrfA_{G145S} mit 16T-Oligonukleotid ist: 0.01 M MgCl₂, 0.05 M Ammoniumacetat, 0.05 M Tris-HCl pH 7.5 und 10 % (w/v) MPD. PrfA_{wt} kristallisierte mit dem 15b_17-Oligonukleotid mit 0.05 M Hepes pH 7, 0.1 M KCl, 0.01 M CaCl₂ und 10 % (w/v) PEG 400.

PrfA_{wt} kristallisierte mit dem Oligonukleotid 14T in der Raumgruppe P6₂22 mit den Gitterkonstanten $a = 111.29 \text{ \AA}$, $b = 111.29 \text{ \AA}$ und $c = 48.5 \text{ \AA}$. Die Datenprozessierung ergab schlechte R_{sym} -Werte sowie eine schlechte χ^2 -Verteilung, so dass der Datensatz für eine Strukturlösung nicht geeignet war. Eine Packungsanalyse ergab zudem, dass nur DNA (2 doppelsträngige Oligonukleotide) in diesem Kristall enthalten sein kann.

Tabelle 7: Erste Daten von PrfA-DNA-Kokristallisationsversuchen.

	16T_Prfa_{G145S}	14T_Prfa_{wt}	15b_17_Prfa_{wt}
Oligolänge/ Überhang	16 bp/ 5'-T	14 bp/ 5'-T	34 bp/ 3'-CG
Reinigung der Oligonukleotide	HPLC	HPLC	HPLC
Auflösung (Å)	3.0	6.0	7.0
Raumgruppe	P4 _x 2 ₁ 2	P6 ₂ 22	P6
Gitterkonstanten	a = b = 95.0 Å, c = 55.7 Å	a = b = 111.3 Å, c = 48.5 Å	a = b = 99.7 Å, c = 135.4 Å
Matthews-Koeffizient (Å ³ /Da) / Lösungsmittelgehalt (%):			
für DNA	3 DS = 2.2 / 43	2 DS = 2.4 / 48	8 DS = 2.2 / 42
für monomeres Protein	2.4 / 47	1.5 / 18	3.4 / 64
für Protein-DNA-Komplex	2.0 / 38	1.3 / 5.5	2.6 / 51

DS = Doppelstränge

Für 16T_Prfa_{G145S} wurde die Raumgruppe P4_x2₁2 mit den Gitterkonstanten a = 95.0 Å, b = 95.0 Å und c = 55.7 Å ermittelt. Ein vollständiger Datensatz wurde von diesem Kristall bis zu einer Auflösung von 3 Å aufgenommen. Die Werte der Datensammlung sind in der Tabelle 8 zusammengefasst. Trotz der qualitativ wertvollen Daten und den intensiven Versuchen zur Phasenbestimmung blieb der Molekulare Ersatz mit Prfa_{G145S} als Suchmodell erfolglos. Die Analyse dieses Kristalls nach Matthews zeigt (Matthews, 1968), dass der Solvensanteil 47 % beträgt, sofern ein Proteinmonomer die asymmetrische Einheit darstellt, hingegen 38 %, wenn für die asymmetrische Einheit ein Protein-DNA-Komplexmonomer angenommen wird. Durchschnittlich zeigen Proteinkristalle einen Solvensanteil von 50 %. Es ist daher wahrscheinlicher, dass der Kristall ausschließlich Protein statt eines Protein-DNA-Komplexes enthält. Da der Molekulare Ersatz mit einem Prfa_{G145S}-Monomer als Modell jedoch nicht gelöst werden konnte, bleibt diese Vermutung unbestätigt. Es könnte sich stattdessen auch um einen reinen DNA-Kristall handeln. Die geringe Anzahl dieser 16T_Prfa_{G145S}-Kristalle sowie deren Größe erschwerten eine Analyse des Kristallinhaltes sowohl im SDS- als auch im Agarose-Gel.

Tabelle 8: Übersicht der Datensammlung von 16T PrfA_{G145S}.

	16T_Prfa _{G145S}
Raumgruppe	P4 _x 2 ₁ 2
Gitterkonstanten	a = 95.0 Å, b = 95.0 Å und c = 55.7 Å
Anzahl der Reflexe	5246
Auflösungsbereich (Å) ¹	30-3.0 (3.1-3.0)
Vollständigkeit (%) ¹	96.1 (96.6)
Redundanz ¹	4.8 (9.9)
R _{sym} (%) ¹	13.9 (22.7)
I/σ _I ¹	8.9 (4.7)
Wilson-Temperaturfaktor (Å ²)	30

¹Die Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale der höchsten Auflösung.

PrfA_{wt} kristallisierte mit dem Oligonukleotid 15b_17 in der Raumgruppe P6 mit den Gitterkonstanten a = 99.7 Å, b = 99.7 Å und c = 135.4 Å. Eine Packungsanalyse ergab, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit ein PrfA-DNA-Komplex vorliegt. Leider streute dieser Kristall die Röntgenstrahlen nur bis zu einer Auflösung von 7 Å.

Trotz intensiver Optimierungsversuche mit verschiedenen Fällungsmittelkonzentrationen, verschiedenen pH-Werten, verschiedenen Salzkonzentrationen, der Zugabe von Additiven und der Variation der molaren Verhältnisse zwischen PrfA und DNA konnten im Zeitrahmen dieser Arbeit keine PrfA-DNA-Kristalle erzeugt werden, die für die Röntgenkristallographie ausreichend streuten.

2.3 Strukturanalyse von C3stau2

2.3.1 Kristallisation von C3stau2

C3stau2 aus *Staphylococcus aureus* gehört zur Familie der C3-ähnlichen ADP-Ribosyltransferasen. Im Gegensatz zu C3bot1 aus *Clostridium botulinum*, dem Hauptrepräsentanten dieser Familie, modifiziert C3stau2 neben RhoA, -B und -C auch die Subtypen RhoE und Rnd3. Um strukturelle Unterschiede aufzudecken, die diese erweiterte Substratspezifität verursachen, sollte mit Hilfe der Röntgenkristallographie die dreidimensionale Struktur von C3stau2 gelöst werden.

Prof. Ingo Just und Dr. Fred Hofmann (Medizinische Hochschule Hannover) stellten C3stau2 als His₆-Fusionsprotein in großen Mengen und in reiner Form zur Verfügung. Die Reinheit von C3stau2 wurde zunächst mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau-Färbung des Gels überprüft (Abbildung 26). Eine N-terminale Sequenzierung der ersten 20 Aminosäuren bestätigte die Aminosäuresequenz, und das apparente Molekulargewicht von 25 kDa wurde massenspektrometrisch bestätigt.

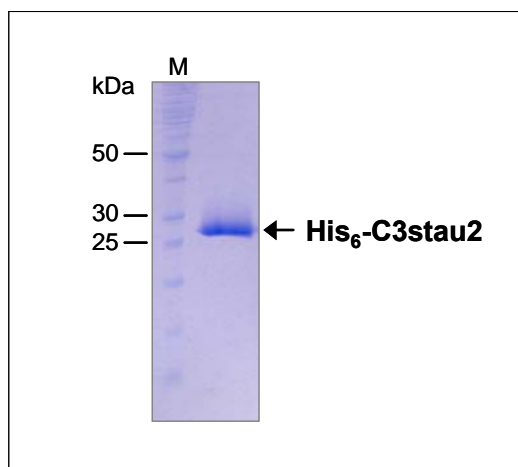


Abbildung 26: SDS-PAGE des C3stau2-Proteins.

Das C3stau2-Fusionsprotein wurde in einem 15 %igen SDS-Gel aufgetragen und nach der SDS-PAGE mit Coomassie-Blau angefärbt. M = Molekulargewichtsstandard.

Vor der Kristallisation wurde das reine C3stau2-Protein auf 5.4 mg/mL konzentriert und 10 min bei 14'000 U/min zentrifugiert, um eventuelle Aggregate abzutrennen. Die Kristallisation wurde nach der Methode des sitzenden Tropfens bei 20°C mit vielen verschiedenen Kristallisations-Screens durchgeführt. Nach vier Wochen wurde ein einziger, kleiner, stäbchenförmiger Kristall unter der Bedingung IV B2 des *Jena Bioscience Screen* (16 % (w/v) PEG 6000, 0.01 M Na-Citrat) erhalten (Abbildung 27). Mit diesem Kristall

konnte ein Datensatz an der GBF unter Verwendung von CuK_α -Strahlung mit einer maximalen Auflösung von 1.9 \AA aufgenommen werden.

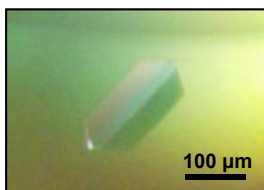


Abbildung 27: Kristall von C3stau2.

Die Kristallisation von C3stau2 (5.4 mg/mL) wurde nach der Methode des sitzenden Tropfens bei 20°C durchgeführt. Die Kristallisationsbedingung für diesen Kristall sind: 16 % (w/v) PEG 6000, 0.01 M Na-Citrat (aus *Jena Bioscience Screen IV B2*).

2.3.2 Datensammlung und Prozessierung

Zur Aufnahme eines vollständigen Datensatzes des C3stau2-Kristalls wurden 110 Aufnahmen bei einer Drehung des Kristalls um 1° pro Aufnahme durchgeführt. Als Kryoschutzmittel wurde 20 % (w/v) PEG 400 verwendet, das dem Kristallisationspuffer zugesetzt wurde. Die Datenprozessierung der aufgenommenen Beugungsbilder erfolgte mit dem *HKL* Programmpaket. Für den C3stau2-Kristall wurde die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12_1$ mit den Gitterkonstanten $a = 41.5 \text{ \AA}$, $b = 64.4 \text{ \AA}$ und $c = 74.7 \text{ \AA}$ ermittelt. Die Vollständigkeit der Daten betrug 99.9 %. Die Bestimmung des Matthews-Koeffizienten legte nahe (Matthews, 1968), dass ein Molekül C3stau2 pro asymmetrischer Einheit vorliegt. Dies entspricht einem Lösungsmittelgehalt von 37.8 % ($V_m = 1.99 \text{ \AA}^3/\text{Da}$). Die Werte der Datensammlung sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht der Datensammlung von C3stau2.

	C3stau2
Raumgruppe	$P2_12_12_1$
Gitterkonstanten	$a = 41.5 \text{ \AA}$, $b = 64.4 \text{ \AA}$, $c = 74.7 \text{ \AA}$
Anzahl der Reflexe	16394
Auflösungsbereich (\AA) ¹	30-1.9 (1.97-1.9)
Vollständigkeit (%) ¹	99.9 (99.9)
Redundanz ¹	4.1 (4.1)
R_{sym} (%) ¹	7.7 (21.3)
I/σ_I ¹	18.2 (6.7)
Wilson-Temperaturfaktor (\AA^2)	18

¹Die in Klammern angegebenen Werte beziehen sich auf die Schale der höchsten Auflösung.

2.3.3 Strukturlösung von C3stau2 durch Molekularen Ersatz

Die Strukturlösung erfolgte mit Hilfe des Molekularen Ersatzes mit dem Programm *EPMR*. Dabei wurde die monomere Struktur von C3bot1 als Modell verwendet (PDB-ID 1G24), das eine Aminosäuresequenzidentität von 35 % zu C3stau2 aufweist. Die beste Lösung zeigte einen Korrelationskoeffizienten von 18 % und einen R-Faktor von 61 %. Mit Hilfe des Programms *O* konnte die Strukturlösung analysiert werden.

2.3.4 Verfeinerung und Qualität der Daten

Die Verfeinerung der C3stau2-Modellstruktur wurde durch abwechselnde Zyklen manueller Anpassung an die Elektronendichteverteilung mit dem Programm *O* und geometrischer Verfeinerung mit dem Programm *REFMAC* durchgeführt. Zur Lokalisation von Wassermolekülen wurde das Programm *ARP/WARP* eingesetzt. Für das C3stau2-Strukturmodell konnte der R-Faktor auf 14.3 % und der freie R-Faktor auf 20.7 % reduziert werden. Die Verfeinerungsstatistik ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Verfeinerungsstatistik der C3stau2-Struktur.

	C3stau2
Auflösungsbereich (Å)	48.8-1.9
Anzahl der Reflexe	15521
durchschnittlicher Temperaturfaktor (Å ²)	15.2
R-Faktor (%)	14.6
freier R-Faktor (%)	20.8
Anzahl der Wassermoleküle	302
Standardabweichung der Bindungslängen von Idealwerten (Å)	0.025
Standardabweichung der Bindungswinkel von Idealwerten (°)	1.98
Ramachandran-Plot (%):	
erlaubter Bereich	93.2
zusätzlich erlaubter Bereich	6.8
großzügig erlaubter Bereich	0
nicht erlaubter Bereich	0

Eine Analyse der Aminosäuren-Konformation der verfeinerten Struktur wurde mit den Programmen *PROCHECK* und *WHATIF* durchgeführt. Der von

PROCHECK generierte Ramachandran-Plot zeigte, dass sich 93.2 % der Hauptkettentorsionswinkel in den erlaubten und 6.8 % in den zusätzlich erlaubten Regionen befinden (Tabelle 10). Sowohl *PROCHECK* als auch das Programm *WHATIF*, das unter anderem Bindungslängen und – winkel untersucht, zeigten, dass das Strukturmodell von C3stau2 von sehr guter Qualität ist.

2.3.5 Die Tertiärstruktur von C3stau2

Die dreidimensionale Struktur von C3stau2 wurde mit Hilfe der Röntgenkristallographie auf atomarer Ebene erfolgreich gelöst. C3stau2 besteht aus einem β -sandwich Kern, der sich aus einem 5-strängigen, gemischten β -Faltblatt (β 1, β 4, β 8, β 7, β 2, jeweils in gelb) und einem 3-strängigen, antiparallelen β -Faltblatt (β 3, β 6, β 5, jeweils in orange) zusammensetzt, welche senkrecht zueinander angeordnet sind (Abbildung 28A). Das 3-strängige β -Faltblatt wird von vier α -Helices (α 1- α 4, blau) und das 5-strängige β -Faltblatt von drei α -Helices (α 5- α 7, türkis) flankiert.

Um eine detaillierte Aussage über die Funktion von C3stau2 machen zu können, sollte ein Modell der C3stau2-Struktur mit gebundenem NAD erstellt werden. Zeitgleich wurde die Struktur von C3stau2 mit und ohne gebundenem NAD von einer konkurrierenden Arbeitsgruppe veröffentlicht (Evans *et al.*, 2003). Diese C3stau2-Struktur wurde ebenfalls in einer orthorhombischen Kristallpackung ($P2_12_12_1$) gelöst (PDB-ID für C3stau2 ohne NAD: 1OJQ, für den C3stau2-NAD-Komplex: 1OJZ). Die Übereinanderlagerung beider C3stau2-Strukturen ergab mit einer Standardabweichung der C_α -Atompositionen von 0.52 Å weitestgehend identische C3stau2-Strukturen. Daher konnte der Komplex der in dieser Arbeit gelösten C3stau2-Struktur mit gebundenem NAD *ad hoc* modelliert werden.

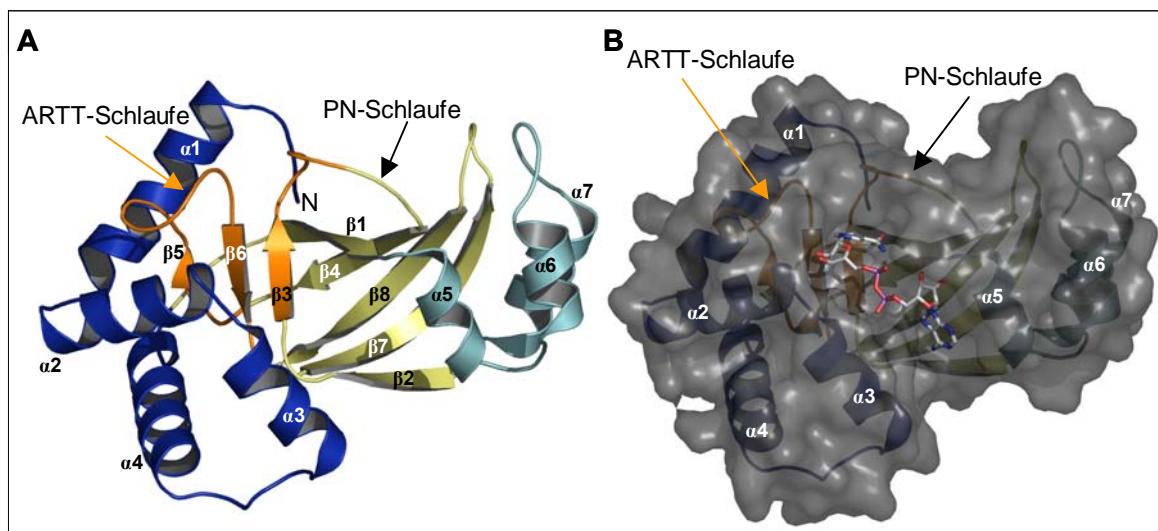


Abbildung 28: Struktur von C3stau2.

In A) ist die Struktur von C3stau2 als Bändermodell dargestellt. α -Helices sind als Spiralen ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) und β -Stränge als Pfeile ($\beta 1$ - $\beta 8$) dargestellt. Die ARTT-(*ADP ribosylating turn turn*)-Schleife (orangefarbener Pfeil) ist an der Substraterkennung beteiligt. Die PN-(Phosphat-Nikotinamid)-Schleife (schwarzer Pfeil) ist an der Stabilisierung der Phosphat-Gruppe und des Nikotinamid-Anteils von NAD beteiligt. In B) sind die Sekundärelemente von C3stau2 mit gebundenem NAD von einer leicht durchsichtigen Oberfläche umgeben (PDB-ID 1OJZ; Evans et al., 2003). NAD ist als Stäbchen-Präsentation dargestellt. Die NAD-Bindungstasche liegt zwischen dem β -sandwich Kern und α -Helix $\alpha 3$, umgeben von der ARTT- und PN-Schleife.

NAD befindet sich im Zentrum von C3stau2 in einer Spalte, die zwischen der α -Helix $\alpha 3$ und dem β -sandwich Kern gebildet wird (Abbildung 28B). Diese NAD-Bindungstasche wird durch zwei Schleifen begrenzt. Die ARTT-(*ADP ribosylating turn turn*)-Schleife ($\beta 5$ - $\beta 6$, AS 170-178) besteht aus 2 benachbarten, hervorstehenden *turns*, die für die Substraterkennung von essentieller Bedeutung sind. Die PN-(Phosphat-Nikotinamid)-Schleife befindet sich zwischen den β -Faltblättern $\beta 3$ - $\beta 4$ (AS 141-150). Eine Phosphatgruppe des NAD wird über Wasserstoffbrückenbindungen mit Arg150 ($\beta 3$ - $\beta 4$, PN-Schleife) stabilisiert, während Leu147 ($\beta 3$ - $\beta 4$, PN-Schleife) van-der-Waals-Kontakte zum Nikotinamid-Ring ausbildet (Abbildung 29). Daher könnte die PN-Schleife für die Stabilisierung des Phosphat- und Nikotinamid-Anteils von NAD verantwortlich sein.

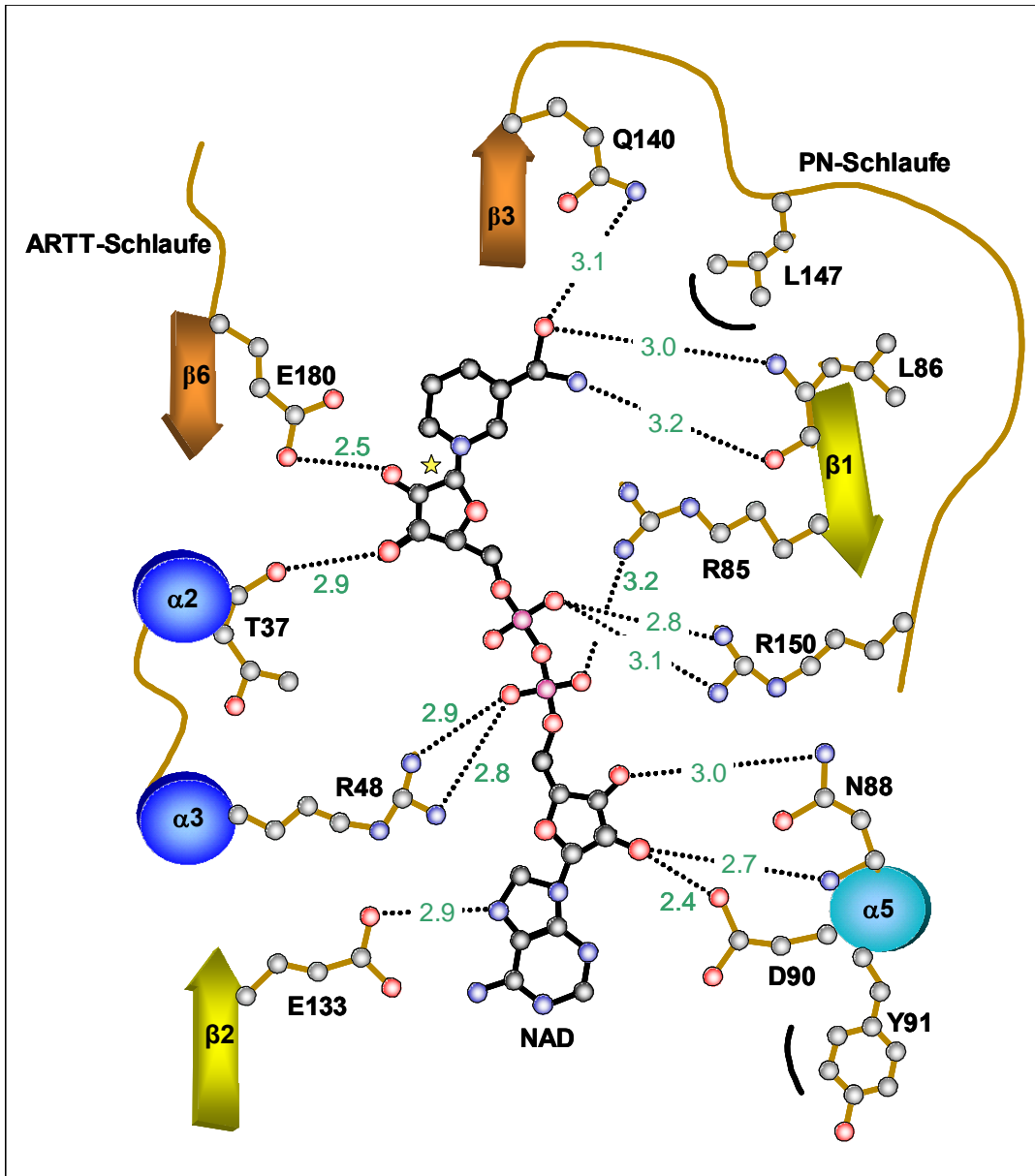


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von C3stau2 mit NAD.

Das NAD-Kohlenstoffgerüst ist in schwarz dargestellt. Die Pfeile repräsentieren β -Stränge, während die Zylinder α -Helices darstellen. Die Farben entsprechen den bereits verwendeten Farben wie in Abbildung 28. Schwarze Bögen stellen hydrophobe Kontakte und gepunktete Linien Wasserstoffbrückenbindungen dar. Der gelbe Stern markiert die Spaltstelle während der ADP-Ribosylierungsreaktion.

Zwischen NAD und C3stau2 finden weitere zahlreiche Wechselwirkungen statt. Die Carbonyl- und Amidgruppe von Leu86 ($\beta 1$) bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit der Carboxamidgruppe des NAD aus. Das katalytische Glu180 ($\beta 6$) am Ende der ARTT-Schleife interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hydroxylgruppe der Nikotinamid-Ribose. Ebenso bildet die Carbonylgruppe von Thr37 ($\alpha 2$) mit der Hydroxylgruppe der Nikotinamid-Ribose eine Wasserstoffbrücke aus. Die Phosphatgruppen des NAD werden durch Wasserstoffbrücken von Arg85 ($\beta 1$) und Arg48 ($\beta 2$) sowie von dem bereits erwähnten Arg150 (PN-Schleife) stabilisiert. Asn88 und

Asp90 (beide $\alpha 5$) interagieren mit den Hydroxylgruppen der Adenin-Ribose. Während Tyr91 ($\alpha 5$) hydrophobe Kontakte mit Adenin bildet, wechselwirkt Glu133 ($\beta 3$) über Wasserstoffbrückenbindung mit einem Stickstoff des Adenins.

Für die ADP-Ribosylierungsreaktion wird die Nikotinamid-Ribosyl-Bindung gespalten (Abbildung 29, gelber Stern) (Oppenheimer, 1994; Han *et al.*, 1999). Die ADP-Ribose wird schließlich auf Asn41 der Rho GTPasen übertragen, während Nikotinamid freigelassen wird.

2.3.6 Strukturvergleich von C3stau2 mit C3bot1

Das Exotoxin C3bot1 aus *C. botulinum* ist das erste Enzym der C3-ähnlichen Familie der ADP-ribosylierenden Transferasen, dessen Struktur mit und ohne gebundenem NAD gelöst wurde (Han *et al.*, 2001; Menetrey *et al.*, 2002). Um einen Hinweis auf die zusätzliche Substratspezifität von C3stau2 zu bekommen, wurde die Struktur von C3stau2 mit der von unkomplexierten C3bot1 mit dem Programm *LSQKAP* übereinandergelagert.

Wie erwartet sind die Strukturen von C3stau2 (blau) und unkomplexiertem C3bot1 (grün) sehr ähnlich (Abbildung 30A). Die offensichtlichen Unterschiede zwischen C3stau2 und C3bot1 sind auf die Aminosäuren 88-110 begrenzt, die in C3stau2 eine helikale Struktur ausbilden ($\alpha 5$ und $\alpha 6$, lila), während sie in C3bot1 die Schlaufe $\beta 1$ - $\alpha 5$ (grün) bilden. Weiterhin befinden sich an dieser Stelle in C3stau2 sieben zusätzliche Aminosäuren, wie der strukturbasierte Sequenzvergleich in Abbildung 30B zeigt.

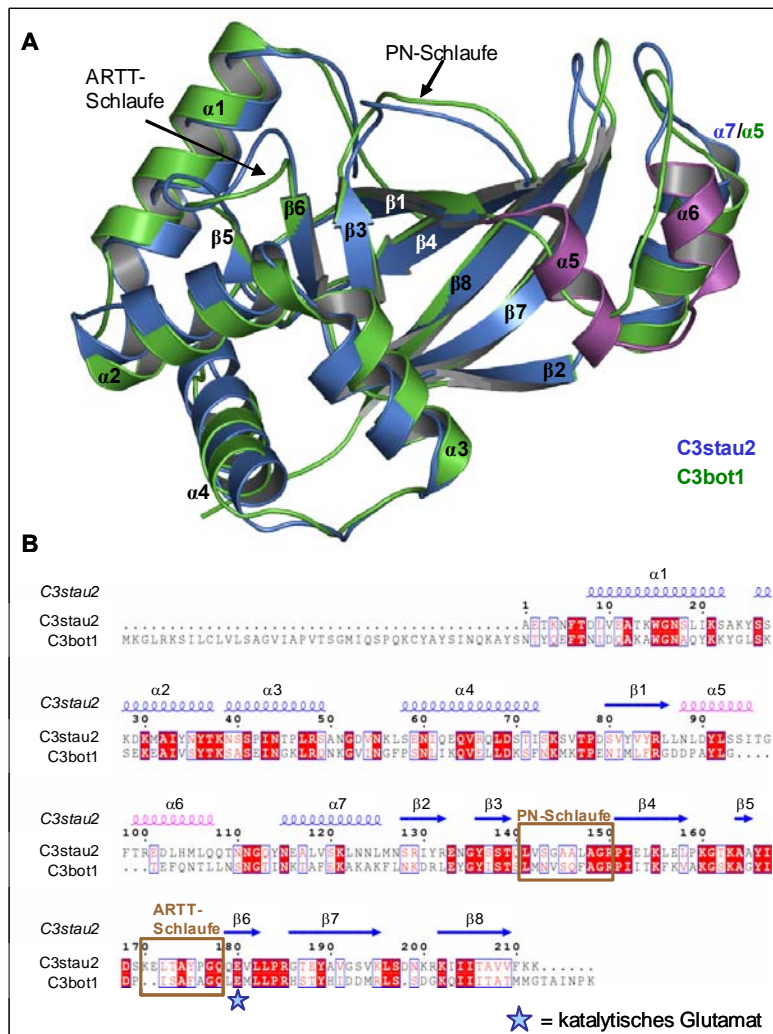


Abbildung 30: Struktureller Vergleich von C3stau2 mit C3bot1.

In A) ist die Überlagerung der Strukturen von C3stau2 (blau) und C3bot1 (PDB-ID 1G24; grün) dargestellt. Die zwei zusätzlichen α -Helices in C3stau2 sind in lila angefarbt. In B) ist ein strukturbasierter Sequenzvergleich von C3stau2 mit C3bot1 gezeigt. Die Sekundärstrukturelemente von C3stau2 sind schematisch über den Aminosäuresequenzen dargestellt: α -Helices sind als Spiralen und β -Stränge als Pfeile dargestellt. Rote Boxen sind identische Aminosäuren, rote Buchstaben sind homologe Aminosäure-Reste. Die Aminosäurebereiche der PN- und ARTT-Schleife sind durch Kästchen hervorgehoben. Die Visualisierung des Sequenzvergleiches erfolgte mit dem Programm *ESPrpt*.

Weitere strukturelle Unterschiede zwischen C3stau2 und unkomplexiertem C3bot1 liegen in den konservierten Bereichen der ARTT- und PN-Schleife. Das C_{α} -Gerüst der ARTT-Schleife, insbesondere *turn* 1 ist in C3stau2 bis zu 5.1 Å im Vergleich zu C3bot1 verlagert (Abbildung 31A1 und A2). Möglicherweise führt die Insertion zweier zusätzlicher Aminosäuren (Lys170 und Glu171) in C3stau2, die vor der ARTT-Schleife lokalisiert sind, zu dieser Konformationsänderung. Die Lage des katalytischen, für alle prokaryotischen ADP-RT essentiellen Glutamats ist in C3stau2 (Glu180) und unkomplexiertem C3bot1 (Glu214) identisch. Die ebenfalls konservierten Aminosäuren Tyr173 und Gln178 in C3stau2 (Phe209 und Gln212 in C3bot1) zeigen dagegen

erhebliche strukturelle Unterschiede auf. Die Seitenketten beider Aminosäuren zeigen in C3stau2 in Richtung der NAD-Bindungstasche, während sie in C3bot1 oberflächenexponiert sind. Umfassende Kristallpackungsanalysen zeigten, dass diese Aminosäuren sowohl in C3stau2 als auch in C3bot1 nicht an Kristallkontakten beteiligt sind.

Interessanterweise entspricht die Konformation der ARTT-Schleife von C3stau2 der NAD-gebundenen Struktur von C3bot1 (Abbildung 31B1 und B2). Auch die Position der Seitenkette von Gln178 ist sehr ähnlich mit ihrer äquivalenten Aminosäure (Gln212) in NAD-gebundenem C3bot1. Ebenso nimmt die essentielle Aminosäure Tyr173 in C3stau2 eine ähnliche Konformation ein, wie die ihrer homologen Aminosäure Phe209 in NAD-gebundenem C3bot1. Trotz der Bedeutung der ARTT-Schleife in prokaryotischen ADP-RT bei der Substraterkennung und -spezifität unterscheiden sich die Konformationen.

Die PN-Schleife ($\beta 3$ - $\beta 4$) ist an der Bindung der Phosphat-Gruppe und des Nikotinamid-Anteils von NAD beteiligt. Die Konformation dieser Schleife in C3stau2 unterscheidet sich sowohl von der PN-Schleife des unkomplexierten als auch von der des NAD-gebundenen C3bot1. Die PN-Schleife in C3stau2 ist stärker in Richtung NAD-Bindungstasche geneigt. Die Standardabweichung der C_{α} -Atompositionen zwischen der PN-Schleife von C3stau2 und unkomplexiertem C3bot1 beträgt 2.6 Å. Diese Schleife ist in C3stau2 jedoch in Kristallkontakte mit symmetrieverwandten Molekülen involviert und kann daher nur unter Vorbehalt verglichen werden.

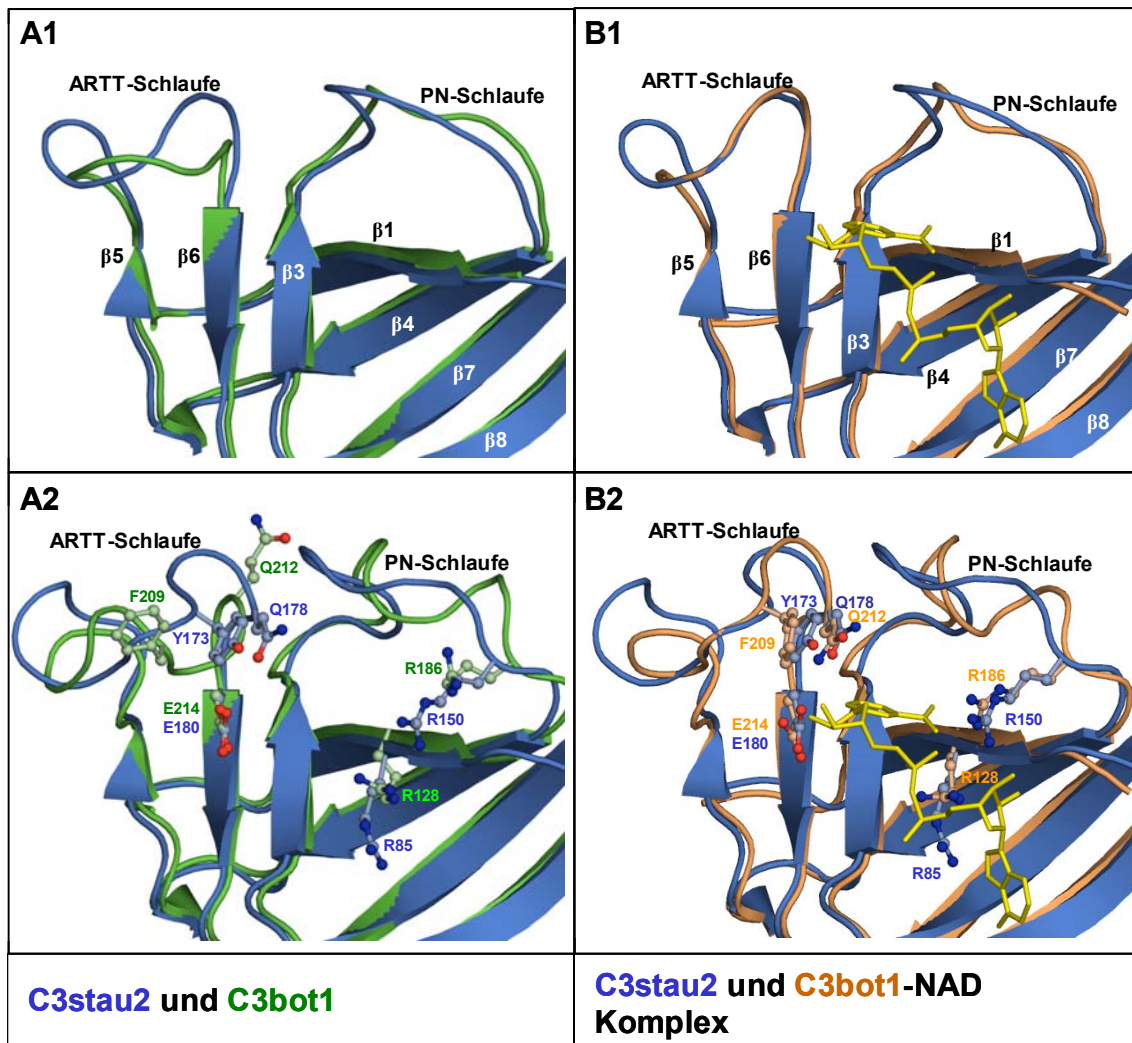


Abbildung 31: Vergleich der Konformation der ARTT-Schleifen von C3stau2 und C3bot1.

In A) ist die Überlagerung von C3stau2 (blau) mit unkomplexiertem C3bot1 (grün) (PDB-ID 1G24) gezeigt. In B) ist die Überlagerung von C3stau2 mit NAD-gebundenem C3bot1 (PDB-ID 1GZF) gezeigt. Beide Darstellungen heben jeweils die Regionen um die ARTT- und die PN-Schleife hervor. In A2) und B2) sind die Konformationsänderungen wichtiger Aminosäuren in diesem Bereich als Kugel-Stab-Präsentation dargestellt. NAD ist als Stäbchen-Modell (gelb) gezeigt.

Der strukturelle Vergleich von C3stau2 mit C3bot1 zeigt eine ähnliche Topologie, wobei C3stau2 zwei zusätzliche α -Helices ($\alpha 5$ und $\alpha 6$) bildet (Abbildung 30A). Diese α -Helices spielen möglicherweise eine wichtige Funktion in der Substratspezifität. Die neue Orientierung der ARTT-Schleife von C3stau2, die der Konformation des NAD-gebundenen C3bot1 ähnelt, zeigt, dass diese Schleife trotz starker Konservierung in allen prokaryotischen ADP-RT eine hohe strukturelle Flexibilität aufweist.

2.4 C3stau2-RhoA-Interaktionsstudien

2.4.1 Produktion und Reinigung von RhoA

Um der Frage nachzugehen, wie bakterielle ADP-ribosylierende Toxine unterschiedliche Substrate erkennen und ob die Helices $\alpha 3$ und $\alpha 5$ von C3stau2 an dieser Substratspezifität beteiligt sind, sollte der Komplex von C3stau2-RhoA strukturell aufgeklärt werden.

Für die Produktion von RhoA stellte Prof. Ingo Just (Medizinische Hochschule Hannover) freundlicherweise das Plasmid pGEX-2TGL-RhoA zur Verfügung. Mit Hilfe dieses Plasmides kann RhoA als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-(Glutathion-S-Transferase)-Anker produziert werden. Zwischen dem GST-Anker und RhoA befindet sich eine Thrombin-Schnittstelle, so dass mit Hilfe der Protease Thrombin der GST-Anteil entfernt werden kann.

Die heterologe Produktion des GST-RhoA-Fusionsproteins erfolgte nach einer Induktion mit 0.1 M IPTG über Nacht bei 20°C im proteasedefizienten *E. coli* Stamm BL21. Die Reinigung des produzierten RhoA wurde zunächst aufgrund des N-terminal fusionierten GST-Ankers mittels Glutathion-Sepharose (GS) über Affinitätschromatographie durchgeführt. Dabei wurde nach verschiedenen Arbeitsschritten Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 32A). Über 50 % lösliches GST-RhoA konnte 20 h nach Induktion mit IPTG produziert werden. Nach der Kopplung des GST-RhoA an die GS war im Durchlauf noch ungebundenes GST-RhoA vorhanden. Auch in den Waschfraktionen befanden sich noch Spuren von GST-RhoA (W1, W2), was darauf schließen ließ, dass eine große Menge an GST-RhoA produziert, doch für die Kopplung eine unzureichende Menge an GS verwendet wurde. Mit einem größeren Bettvolumen (ca. 10 mL) an GS konnte in nachfolgenden RhoA-Produktionen schließlich eine vollständige Protein-Kopplung erfolgen.

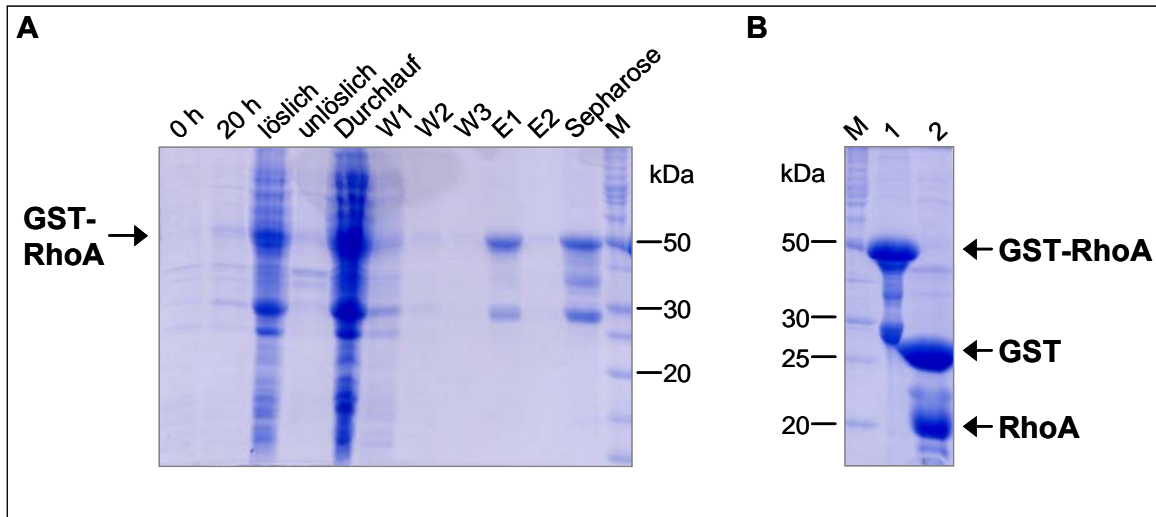


Abbildung 32: Produktion und Reinigung von GST-RhoA.

A) Nach verschiedenen Arbeitsschritten während der Reinigung wurden Proben entnommen und im 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit Coomassie-Blau-Färbung. 0 h = vor Induktion, 20 h = 20 h nach Induktion mit 0.1 M IPTG, W1-W3 = Waschfraktionen, E1 und E2 = Elutionsfraktionen. B) Die Abspaltung des GST-Fusionsanteils von RhoA erfolgte mit Thrombin in Lösung. 1 = vor dem Thrombin-Verdau, 2 = 20 h nach Thrombin-Verdau, M = Molekulargewichtsstandard.

Bei der Elution von GST-RhoA mit Glutathion-haltigem Elutionspuffer wurde das Fusionsprotein fast vollständig von der Säule eluiert (E1, E2). Die mit Sepharose gekennzeichnete Fraktion in Abbildung 32A zeigt die Beladung der Sepharose vor der Elution.

Die Spaltung des GST-RhoA-Fusionsproteins wurde sowohl in GS-gebundenem Zustand wie auch in Lösung mit Thrombin vorgenommen (Abbildung 32B). Es wurde jeweils eine annähernd hundertprozentige Abspaltung von GST erreicht. Zur Entfernung des GST-Anteils in der Proteinlösung wurde eine Rechromatographie mit GS durchgeführt (nicht gezeigt).

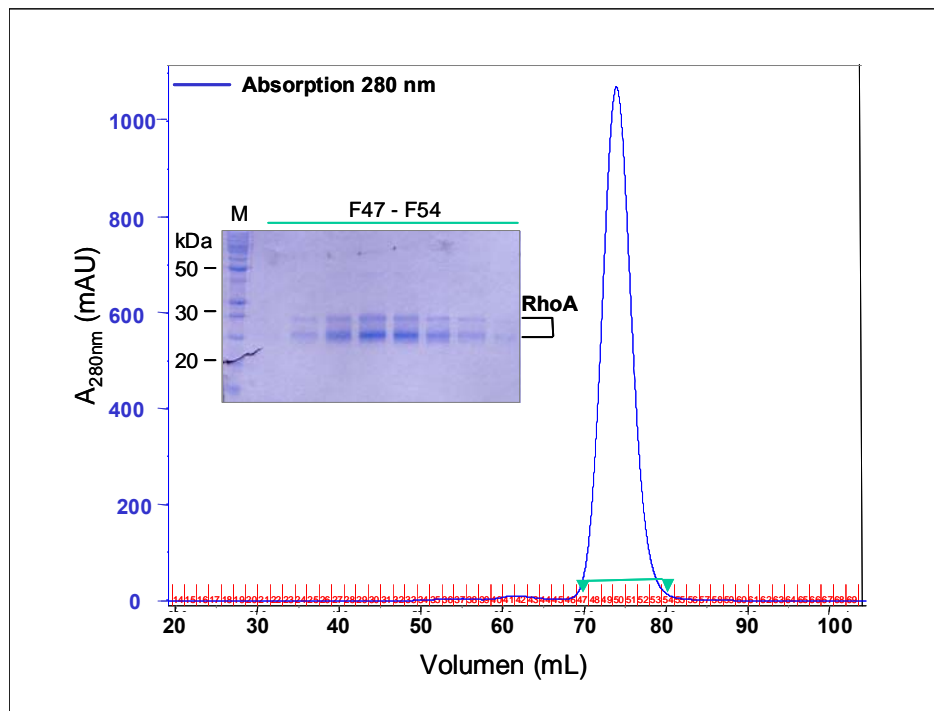


Abbildung 33: Reinigung von RhoA mittels Gelfiltration.

Das Chromatogramm der Gelfiltration (Superdex 75 *prep grade* 16/60) zeigt in blau die Absorption der Proteine bei 280 nm. Die Abszisse zeigt in rot die Fraktionen und in schwarz das Volumen. Das mit Coomassie-Blau gefärbte SDS-Gel zeigt die analysierten Fraktionen mit erhöhter Absorption. Eine Zuordnung der analysierten Fraktionen ist durch die grüne Linie angedeutet. M = Molekulargewichtsstandard.

Noch verbliebene Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine wurden durch eine anschließende Gelfiltration (Superdex 75 *prep grade* 16/60; 20 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl) von dem RhoA entfernt. Die Gelfiltration ergab ein einzelnes Absorptionsmaximum, dessen Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau-Färbung analysiert wurden (Abbildung 33). RhoA zeigt im SDS-Gel zwei verschmierte Banden. Dies ist bereits früher beobachtet worden und wurde als Gel-Artefakt beschrieben (Self & Hall, 1995). Die N-terminale Sequenzierung sowie die massenspektrometrische Analyse dieser RhoA-Proben bestätigten, dass RhoA mittels Gelfiltration bis zur Homogenität gereinigt wurde und dass die oben beschriebenen RhoA-Banden ebenfalls Gel-Artefakte sein könnten. Reine RhoA-Fractionen wurden vereint, auf 10 mg/mL konzentriert und bei 4°C gelagert. Nach diesem Reinigungsprotokoll konnten erfolgreich bis zu 25 mg reines RhoA aus 2 L *E. coli*-Flüssigkultur gewonnen und für die nachfolgenden Experimente eingesetzt werden.

2.4.2 Untersuchung der C3stau2-RhoA -Interaktion mittels Gelfiltration

Eine wichtige Voraussetzung für die Kokristallisation von C3stau2 mit RhoA ist die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen den beiden Einzelkomponenten. Die ADP-Ribosylierung ist eine schnelle enzymatische Reaktion, daher sollten für eine stabile Komplexbildung Zwischenschritte der ADP-Ribosylierung inhibiert werden, so dass zwischen C3stau2 und RhoA eine Assoziation, aber keine Dissoziation stattfindet. Zwei wichtige Zwischenschritte sind die Abspaltung des ADP-Ribose-Anteils von NAD in C3stau2 sowie der Transfer der ADP-Ribose auf Asn41 in RhoA. Für die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen C3stau2 und RhoA wurden daher zwei Ansätze verfolgt. Beim ersten Ansatz sollte C3stau2 zunächst mit TAD (β -Methylen-thiazol-4-carboxamid Adenindinukleotid) komplexiert werden. TAD ist ein NAD-Analogon, das nicht hydrolysiert wird, da der Pyridinring des Nikotinamids durch einen Thiazolring ersetzt wurde und anstelle einer N-glykosidischen Bindung eine C-glykosidische Bindung vorliegt (Pankiewicz *et al.*, 2002). Folglich kann TAD nicht in Nikotinamid und ADP-Ribose gespalten werden und es findet keine Ribosylierung statt. Durch die Strukturen zweier ADP-Ribosyltransferasen mit TAD, Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* (Li *et al.*, 1996) und ecto-ADP-RT aus der Ratte (Ritter *et al.*, 2003), konnte jedoch gezeigt werden, dass TAD in der NAD-Bindungstasche gebunden wird und eine ähnliche Konformation wie NAD einnimmt.

Im zweiten Ansatz sollte NAD-gebundenes C3stau2 mit RhoA_{N41S} komplexiert werden. Die ADP-Ribosylierung von RhoA erfolgt an Asn41. In RhoA_{N41S} ist Asn41 jedoch zu Ser41 mutiert, so dass kein Transfer der ADP-Ribose an RhoA stattfinden kann (Sekine *et al.*, 1989). Das für die Komplexbildung eingesetzte RhoA_{N41S} wurde freundlicherweise von Prof. Ingo Just (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt. Im Folgenden wird zur besseren Differenzierbarkeit RhoA-Wildtyp als RhoA_{wt} bezeichnet.

Zunächst sollte die C3stau2-RhoA-Wechselwirkung dieser beiden Ansätze mit Hilfe der analytischen Gelfiltration (Superdex 75 *prep grade* 10/30) untersucht werden. Dafür wurde zunächst das Elutionsvolumen von unkomplexiertem C3stau2 und unkomplexiertem RhoA ermittelt. Anschließend wurden C3stau2 und RhoA in einem molaren Verhältnis von 1:1 zusammengegeben und auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Abbildung 34 zeigt die Übereinanderlagerung der Elutionsprofile des unkomplexierten C3stau2, des unkomplexierten RhoA_{wt} sowie des C3stau2-RhoA_{wt}-Komplexes. In dem Chromatogramm ist

das Elutionsprofil von C3stau2 als grüne Linie und das Elutionsprofil von RhoA als rote Linie gezeigt. Nach Zugabe des C3stau2-RhoA_{wt}-Komplexes auf die Gelfiltrationssäule sind zwei voneinander getrennte Absorptionsmaxima (blaue Linie) zu erkennen, die vom Elutionsvolumen exakt mit den Einzelkomponenten RhoA_{wt} und C3stau2 übereinstimmen. Demzufolge hatte sich kein stabiler Komplex zwischen RhoA_{wt} und C3stau2 gebildet. Auch zwischen RhoA_{N41S} und C3stau2 wurde kein Komplex gebildet, der mit der Gelfiltration nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnte durch die Zugabe der jeweiligen Kofaktoren NAD/TAD und GDP, der Variation der Inkubationszeit und der Veränderung der molaren Verhältnisse kein stabiler C3stau2-RhoA-Komplex detektiert werden.

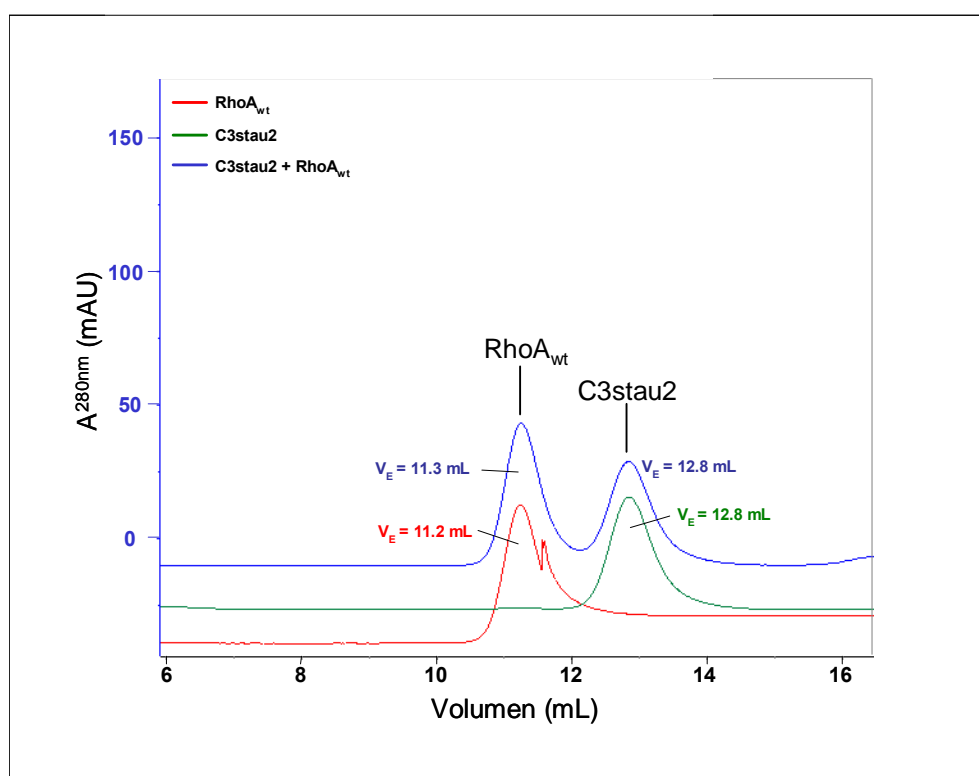


Abbildung 34: Gelfiltrationsstudie zur C3stau2-RhoA-Interaktion.

Das Chromatogramm zeigt die Überlagerung von verschiedenen Gelfiltrationsläufen auf einer Superdex 75 *prep grade* 10/30. Das Elutionsprofil von RhoA_{wt} ist in rot, das von C3stau2 in grün und das des C3stau2-RhoA-Komplexes in blau dargestellt. Die Ordinate zeigt die Absorption bei 280 nm. V_E = Elutionsvolumen.

2.4.3 Untersuchung der C3stau2-RhoA-Interaktion mittels SPR

Im Vergleich zur Gelfiltration können mittels SPR Protein-Protein-Wechselwirkungen bei sehr niedrigen Affinitäten analysiert und in Echtzeit verfolgt werden. Daher wurde diese Methode gewählt, um die Bindung von

RhoA an C3stau2 näher zu untersuchen. C3stau2 wurde über eine Aminkopplung auf einen CM5-Chip gekoppelt, während RhoA in BIAcore-Puffer I injiziert wurde.

Nach Injektion von RhoA über den Chip erfolgte sogleich ein starker Anstieg der Resonanzeinheiten, der auf die Zunahme der Dichte durch RhoA zurückzuführen ist. Nach Pufferzugabe ohne RhoA fiel das Signal wieder auf den Ursprungswert. Eine Assoziation bzw. Dissoziation war nicht zu erkennen. Auch die Zugabe von NAD/TAD und GDP zum Puffersystem erzielte keine Bindungskurve. Eine spezifische Bindung zwischen C3stau2 und RhoA_{wt} wie auch RhoA_{N41S} konnte demnach nicht bestätigt werden.

2.4.4 Kristallisation des C3stau2-RhoA-Komplexes

Obwohl bei der Gelfiltration als auch bei der SPR-Analyse keine Komplexbildung zwischen C3stau2 und RhoA detektiert wurde, wurden Kokristallisationen von C3stau2 und RhoA angesetzt. Für die Kristallisation von C3stau2 mit RhoA wurde zunächst C3stau2 mit NAD oder TAD und RhoA mit GDP versetzt. Aufgrund von Kokristallisationsstudien von RhoA mit einer Serin/Threonin Kinase (Maesaki *et al.*, 1999) wurde C3stau2/NAD bzw. C3stau2/TAD mit RhoA_{N41S}/GDP bzw. RhoA_{wt}/GDP in einem molaren Verhältnis von 1:2 45 min bei 4°C inkubiert. Die Kokristallisationsversuche wurden unter einer Vielzahl von Bedingungen bei 4°C durchgeführt.

In fünf unterschiedlichen Pufferbedingungen wurden nach ca. fünf Wochen Kristalle mit unterschiedlichem Habitus erhalten, die C3stau2/TAD und RhoA_{wt}/GDP enthalten sollten. Für eine Untersuchung des Inhaltes dieser Kristalle im SDS-Gel waren die Kristalle zu klein. Daher wurden diese Kristallisationsversuche mit den Einzelkomponenten RhoA_{wt}/GDP bzw. C3stau2/TAD durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass unter drei dieser Kristallisationsbedingungen RhoA_{wt}/GDP auch alleine kristallisierte. Die Kristalle der letzten beiden Kristallisationsbedingungen, in denen weder C3stau2 noch RhoA_{wt} alleine kristallisierten, sind in Abbildung 35 dargestellt.

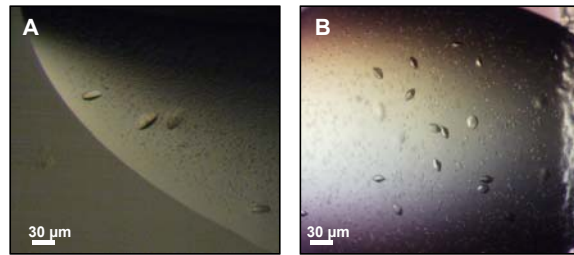


Abbildung 35: Kristalle des C3stau2-RhoA-Komplexes.

Die Kristalle wurden nach der Methode des sitzenden Tropfens bei 4°C generiert. Die stäbchenförmigen Kristalle in A sind mit C3stau2/TAD und RhoA_{wt}/GDP unter der Bedingung III B1 des *Jena Bioscience Screen* (15 % (w/v) PEG 4000, 0.2 M Ammoniumsulfat) gewachsen. Die linsenförmigen Kristalle in B sind mit C3stau2/TAD und RhoA_{wt}/GDP unter der Bedingung des *Crystal Screen* II Nr. 39 (0.2 M MgCl₂, 0.1 M Tris pH 8.5, 3.4 M 1,6-Hexandiol) gewachsen.

Die stäbchenförmigen Kristalle in Abbildung 35A wuchsen unter der Bedingung III B1 des *Jena Bioscience Screen*. Diese Kristalle wurden am Synchrotron in Hamburg (Beamline BW6, DESY, Hamburg) vermessen und streuten die Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 14 Å. Die linsenförmigen Kristalle in Abbildung 35B wuchsen unter der Bedingung II Nr. 39 des *Crystal Screen*. Diese Kristalle zeigten jedoch keine Reflexe mit Synchrotron-Strahlung (Beamline BW6, DESY, Hamburg). Beide Kristallbedingungen sollten optimiert werden, um größere Kristalle zu erhalten, die eine bessere Streuung der Röntgenstrahlen hervorrufen und die bezüglich ihrer Zusammensetzung im SDS-Gel untersucht werden könnten. Trotz der Verwendung von frisch gereinigten Proteinen konnten die Kristalle im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden.

3 Diskussion

3.1 *PrfA ist strukturell verwandt mit Cap und CoxA*

PrfA, der positiv regulierte Transkriptionsfaktor A aus *Listeria monocytogenes*, wurde aufgrund von Aminosäuresequenzvergleichen in die bakterielle Crp/Fnr-Familie eingeordnet (Lampidis *et al.*, 1994; Vega *et al.*, 1998; Körner *et al.*, 2003). Durch den strukturellen Vergleich der in dieser Arbeit gelösten dreidimensionalen Struktur von PrfA mit Cap, dem prominentesten Präsentanten dieser Familie (Weber & Steitz, 1987), kann die Einordnung in die Crp/Fnr-Familie eindeutig bestätigt werden (Abbildung 36). Neben PrfA und Cap ist die Struktur eines weiteren Mitglieds dieser Familie bekannt, die Struktur von CoxA, einem durch Kohlenmonoxid aktivierten Transkriptionsfaktor aus *Rhodospirillum rubrum* (Lanzilotta *et al.*, 2000). Sowohl Cap als auch CoxA sind wie PrfA Homodimere, die aus einem N-terminalen β -Fass bestehen, das über eine lange α -Helix (α C) mit einer C-terminalen DNA-bindenden Domäne verbunden ist.

Die Übereinanderlagerung der verwandten N-terminalen β -Fass Domäne von PrfA_{G145S} mit Cap oder CoxA ergab eine Standardabweichung der gemeinsamen C $_{\alpha}$ -Atompositionen von 1.32 Å bzw. 1.43 Å. Trotz dieser ähnlichen Topologie sind beträchtliche strukturelle Unterschiede zwischen den Proteinen in den N-terminalen Domänen zu erkennen. Ein Grund für diese Unterschiede liegt vermutlich darin, dass die N-terminalen Domänen jeweils Bindungstaschen für chemisch unterschiedliche Effektoren beinhalten: Bindungstasche für cAMP bei Cap bzw. für Häm bei CoxA. Für PrfA ist die Frage, ob ein Effektor benötigt wird, derzeit noch nicht geklärt.

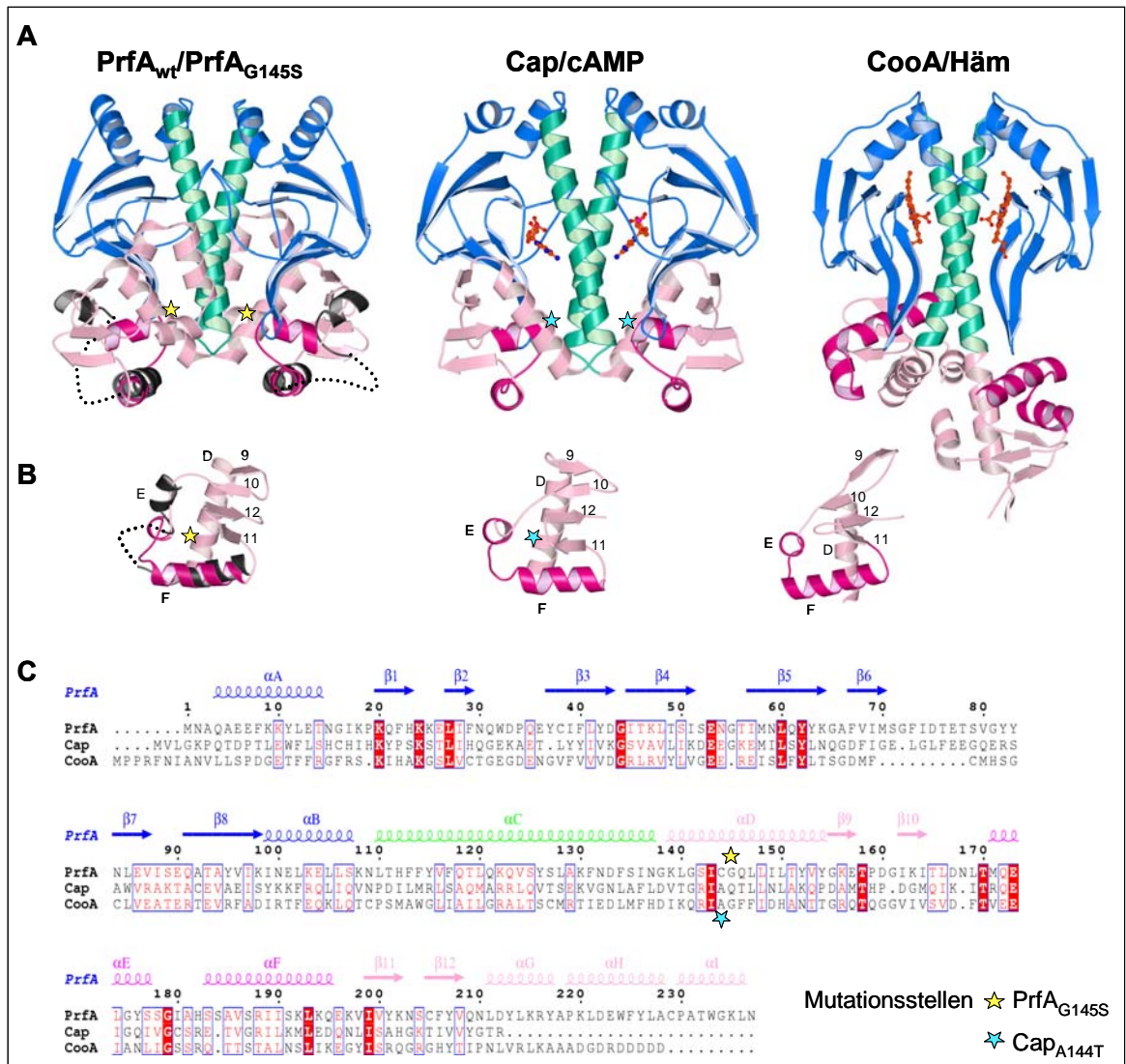


Abbildung 36: Struktureller Vergleich von PrfA, Cap und CooA.

In A) sind drei Transkriptionsfaktoren PrfA, Cap und CooA der Crp/Fnr-Familie in gleicher Orientierung und mit den entsprechenden Farben aus Abbildung 14 (S. 39) dargestellt. Zyklisches AMP von Cap (PDB-ID 1G6N) sowie die Hämgruppe von CooA (PDB-ID 1FT9) sind als Kugel-Stab-Modelle in orange dargestellt. Das HTH-Motiv von PrfA_{wt} ist in dunkelgrau gezeigt. In B) sind die *winged* HTH-Motive der drei Strukturen vergrößert und in gleicher Orientierung dargestellt. In C) ist ein strukturbasierter Sequenzvergleich von PrfA, Cap und CooA gezeigt.

Auch die C-terminale Domäne, die ein *winged* HTH-Motiv besitzt, ist in Cap, PrfA und CooA (Abbildung 36B) sehr ähnlich. Bei *winged* HTH-Motiven handelt es sich um Erweiterungen der klassischen HTH-Motive für die DNA-Bindung, die, durch β -Stränge und Zwischenschlaufen ergänzt, einem Schmetterlingsflügel gleichen sollen (Brennan, 1993; Wintjens & Rooman, 1996; Gajiwala & Burley, 2000; Aravind *et al.*, 2005). Die Standardabweichung der C $_{\alpha}$ -Atompositionen dieser HTH-Motive zwischen PrfA_{G145S} und Cap bzw. PrfA_{G145S} und CooA beträgt lediglich 1.05 Å.

Cap und CooA sind Kofaktor-abhängige Transkriptionsfaktoren. Durch die Bindung von cAMP oder CO wird die Affinität für DNA beider Proteine

erhöht. Von Cap gibt es Kristallstrukturen mit und ohne DNA, aber stets mit gebundenem cAMP, während die Struktur von apo-Cap (ohne cAMP) bisher nicht gelöst werden konnte. Für CooA ist lediglich eine CO-freie Kristallstruktur ohne DNA vorhanden. Kein Mitglied der Crp/Fnr-Familie ist demnach strukturell in allen drei Zuständen (nicht-induzierter (apo), induzierter, DNA-freier und induzierter, DNA-gebundener Zustand) aufgeklärt, so dass der Prozess der Induktion durch den Kofaktor und die anschließende DNA-Bindung zur Zeit nur unvollständig beschrieben werden konnte.

Die konstitutiv aktive Mutante PrfA_{G145S} ist funktionell analog zu Cap_{A144T}, eine Cap-Mutante, bei der Ala144 durch Threonin substituiert ist. Die Mutation ist wie G145S in der α -Helix α D lokalisiert und führt zu einer konstitutiv aktiven, cAMP-unabhängigen Mutante von Cap. Die DNA-Bindungsaffinität von Cap_{A144T} entspricht der von Cap/cAMP (Passner *et al.*, 2000; Harman, 2001). Die Struktur von Cap_{A144T} wurde ebenfalls gelöst, jedoch wiederum nur in Anwesenheit von cAMP (Weber *et al.*, 1987).

3.2 Möglicher Aktivierungsmechanismus von PrfA

Die Konformation der C-terminalen Domäne und insbesondere das HTH-Motiv von PrfA_{G145S} ähneln in bemerkenswerter Weise der von Cap/cAMP, Cap_{A144T}/cAMP und insbesondere DNA-gebundenem Cap/cAMP (Abbildung 37). PrfA_{wt} hingegen unterscheidet sich signifikant von allen Cap/cAMP-Strukturen, vor allem da die Position der α -Helix α E des HTH-Motivs deutlich verschoben ist und die Schleife α E- α F ungeordnet vorliegt. Sowohl Cap_{A144T}/cAMP wie auch Cap/cAMP gleichen konformationell einem induzierten, DNA-gebundenen Zustand. Falls PrfA einem Aktivierungsmechanismus wie Cap unterliegt, würde PrfA_{G145S} den induzierten DNA-gebundenen Zustand nachahmen, während PrfA_{wt} den nichtinduzierten Zustand repräsentieren würde und damit strukturell dem apo-Cap entspräche.

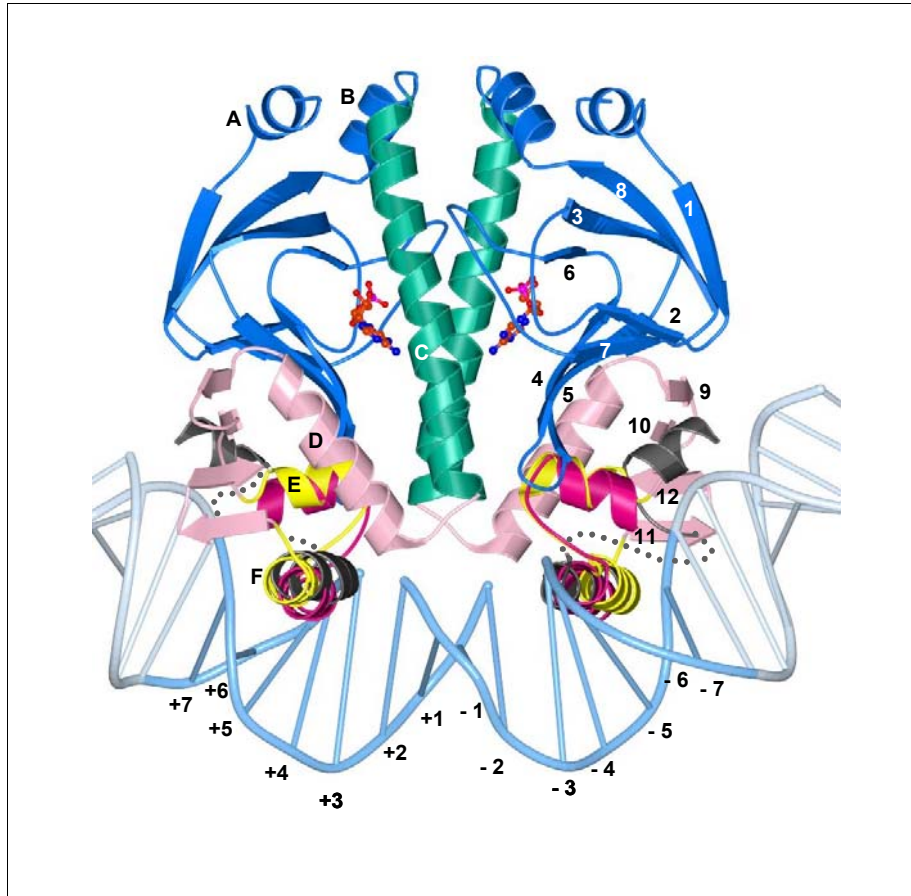


Abbildung 37: Überlagerung von PrfA_{wt}/PrfA_{G145S} und DNA-gebundenem Cap/cAMP.

Die Überlagerung der Strukturen erfolgte mit Hilfe des DALI-Servers (Holm & Sander, 1998). Von PrfA_{wt} und PrfA_{G145S} sind nur die HTH-Motive in dunkelgrau bzw. pink dargestellt. Cap ist dagegen mit den entsprechenden Farben aus Abbildung 14 (S. 39) gekennzeichnet und das HTH-Motiv in gelb gezeigt. Alle Hauptkontakte zwischen Cap und der DNA in der DNA-gebundenen Cap/cAMP-Struktur (PDB-ID 2CGP) involvieren die 14 zentralen Basenpaare der 22 bp langen Erkennungssequenz des Cap für DNA (Parkinson *et al.*, 1996; Lawson *et al.*, 2004). Das entspricht den 14 bp der PrfA-Box und legt nahe, dass PrfA und Cap DNA auf vergleichbare Weise binden. Die zentralen 14 bp sind in hellblau und die restlichen Basenpaare in blassblau dargestellt.

Die Kristallstrukturen der beiden PrfA-Zustände erlauben demnach die Folgerung, dass die Aktivierung von PrfA durch Begradigung der α -Helix α C erfolgt, die zu einer Neuorientierung und Stabilisierung des HTH-Motivs führt. Dabei kommt es zur Verschiebung von α E des HTH-Motivs und der benachbarten Schlaufen β 10- α E und α E- α F.

Von apo-Cap ist bisher nur eine NMR-Struktur gelöst worden (Won *et al.*, 2000). Der Vergleich dieser NMR-Struktur mit der Kristallstruktur von Cap/cAMP konnte Unterschiede in den Sekundärelementen aufzeigen, die vor allem die β -Faltblätter β 3 und β 6, die Schlaufen β 3- β 4 und β 6- β 7 sowie die Gelenkregion in α C betreffen. Protein *footprinting*-Studien hingegen deuten auf cAMP-induzierte strukturelle Änderungen in α D, α E, α F und β 9 und β 11 in der C-terminalen Domäne hin (Baichoo & Heyduk, 1999). Letztere

Änderungen stehen eher mit den zwischen PrfA_{wt} und PrfA_{G145S} beobachteten strukturellen Neuorientierungen im Einklang.

Zwei mit Cap verwandte Proteine, cAPK (eine cAMP-abhängige Proteinkinase, Taylor *et al.*, 1990) und Epac2 (ein Rap-spezifisches Guaninnukleotid-freisetzendes Protein (GEF), de Rooij *et al.*, 1998), werden ebenfalls durch cAMP aktiviert und besitzen eine ähnliche N-terminale Domäne. Die Struktur von cAPK konnte sowohl mit (Diller *et al.*, 2001) als auch ohne cAMP (Wu *et al.*, 2004) und die Struktur von Epac2 bisher nur ohne cAMP gelöst werden (Rehmann *et al.*, 2003). Diese Strukturen, die den nicht-induzierten und den induzierten, DNA-freien Zustand repräsentieren, deuten darauf hin, dass cAMP eine Bewegung der langen α -Helix α C induziert (Wu *et al.*, 2004). Demnach könnte die „Begradigung“ von α C ein Aspekt eines allgemeingültigen Aktivierungsmechanismus des PrfA, Cap und Cap-verwandter Proteine sein.

Eine weitere Umorientierung bei der Aktivierung von PrfA betrifft die Schlaufe β 4- β 5 (diese Arbeit). Im Vergleich zu PrfA_{wt} scheint β 4- β 5 in PrfA_{G145S} eine laterale Bewegung durch die Bewegung von α C und α D auszuführen, so dass α E und das HTH-Motiv auch durch β 5 stabilisiert werden.

In Cap bildet β 4- β 5 einen Deckel über der Bindungstasche des cAMP, die bis zu 10 Å von dem DNA-Bindungsmotiv entfernt ist. Gleichzeitig steht β 4- β 5 in Kontakt mit dem HTH-Motiv (Passner *et al.*, 2000). Die Bindung von cAMP kann dadurch sowohl zur „Begradigung“ von α C als auch zur Bewegung von β 4- β 5 führen und damit möglicherweise zu einer Neuorientierung des HTH-Motivs (Harman, 2001). Während die Bewegung von β 4- β 5 in Cap direkt durch die Bindung von cAMP induziert wird, scheint die entsprechende Bewegung bei PrfA_{G145S} indirekt durch die Mutation in α D verursacht zu werden.

3.3 Benötigt PrfA einen Kofaktor?

Die Bindung des allosterischen Effektors cAMP an Cap induziert Konformationsänderungen vor allem in der DNA-bindenden Domäne und erhöht dabei die DNA-Bindungsaffinität um mindestens drei Größenordnungen von einer eher unspezifischen bis zu einer spezifischen Bindung (Harman, 2001). Die cAMP-unabhängigen Cap-Mutanten wie Cap_{A144T}

erreichen vergleichbare DNA-Bindungsaffinitäten wie Cap/cAMP und imitieren demnach die Kofaktor-gebundene Konformation. PrfA_{G145S} ist funktionell und strukturell Cap_{A144T} sehr ähnlich und imitiert daher möglicherweise auch eine Kofaktor-gebundene Konformation. Im Gegensatz zu Cap ist bisher jedoch kein Ligand oder allosterischer Effektor für PrfA identifiziert worden.

Eine mögliche Bindungsstelle für einen Effektor ist die β -Fass-Domäne, wie bereits in CooA (Lanzilotta *et al.*, 2000) oder in AraC, einem Transkriptionsfaktor aus *E. coli* (Soisson *et al.*, 1997), gezeigt wurde. In CooA wird die CO-bindende Häm-Gruppe von der Schlaufe $\beta 6$ - $\beta 7$ und der α -Helix αC erkannt, während L-Arabinose in AraC mittig im β -Fass - also an anderer Position - gebunden wird. Auch Cap, dessen N-terminale Domäne topologisch sehr ähnlich zu PrfA ist, bindet cAMP im β -Fass.

Bei Betrachtung der Oberfläche von PrfA_{wt} ist in jedem Monomer ein ausgeprägter Tunnel zwischen β -Fass und C-terminaler, DNA-bindender Domäne zu erkennen (Abbildung 38A). Dieser Tunnel erstreckt sich über eine Gesamtlänge von ca. 17 Å. Eine maximale Breite von 7.7 Å befindet sich an dem zur N-terminalen Domäne von PrfA weisenden Ende, während der Tunnel an dem zur C-terminalen Domäne weisenden Ende extrem schmal wird (max. 2.5 Å). Die C-terminalen α -Helices αH und αI sind wie αC , αD und $\beta 5$ sehr wichtig für die Ausbildung dieses Tunnels. Die Verschiebung von αE in PrfA_{G145S} schließt diesen Tunnel an dem zur DNA-bindenden Domäne weisenden Ende. In Cap bindet cAMP in einem ähnlichen, jedoch räumlich unverwandten Tunnel und bestätigt die Vermutung, der Tunnel in PrfA könne ebenfalls einen Kofaktor beherbergen. Interessanterweise ist innerhalb des Tunnels in einem Monomer von PrfA_{wt} und in zwei Monomeren von PrfA_{G145S} Differenzelektronendichte zu erkennen. Diese Dichte konnte durch DTT, das während der Kristallisation zum Schutz vor der Oxidation von Cysteinen zugegeben wurde, erklärt werden (Abbildung 38B). Die Lokalisation des DTT im Tunnel unterstützt daher die Hypothese, dass auch ein putativer Kofaktor im Tunnel von PrfA binden könnte.

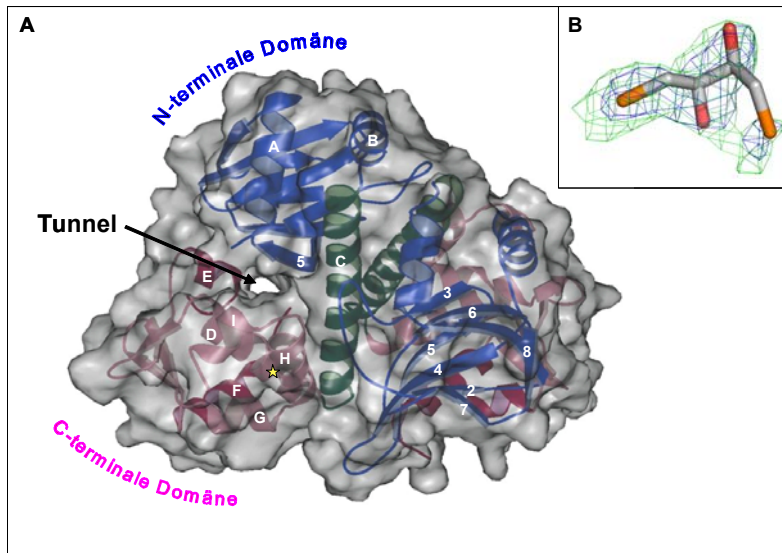


Abbildung 38: Tunnel in der PrfA_{wt}-Oberfläche als Indiz für Kofaktorbindung.

In A) ist PrfA_{wt} entsprechend den Farben aus Abbildung 14 (S. 39) dargestellt und von einer durchsichtigen Oberfläche umgeben. Ein Tunnel wird zwischen αC, αD, αH, αI und β5 gebildet. Die Mutationsstelle von PrfA_{G145S} ist durch ein Sternchen markiert. In B) ist die Elektronendichte in blau und die Differenzelektronendichte in grün dargestellt, die innerhalb des Tunnels lokalisiert sind. Das für diese Dichte beschriebene DTT ist als Stäbchen-Präsentation gezeigt.

PrfA zeigt bei Eintritt der Listerien in die Wirtszellen volle Aktivität. Außerhalb der Wirtszelle ist es dagegen nur schwach aktiv (Moors *et al.*, 1999; Shetron-Rama *et al.*, 2002). Ursächlich dafür könnte die Aktivierung der PrfA-Translation durch den Temperaturwechsel sein (Johansson *et al.*, 2002). Doch die PrfA-abhängige Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes* ist *in vitro* bei 37°C sehr schwach (Ripio *et al.*, 1996). Daher wird angenommen, dass zusätzliche Mechanismen wie eine posttranslationale Modifikation von PrfA oder aber ein Kofaktor aus den Wirtszellen zur Aktivierung von PrfA führen (Ripio *et al.*, 1997a; Vega *et al.*, 1998). Bisher konnte aber noch kein Wirts-abhängiger Kofaktor für PrfA identifiziert werden.

Vor kurzem wurde jedoch entdeckt, dass *L. monocytogenes* eine hydrophobe Substanz sekretiert, die direkt oder indirekt als Inhibitor von PrfA fungiert (Ermolaeva *et al.*, 2004). Dieser Inhibitor hat jedoch keinen Einfluss auf die konstitutiv aktive Mutante von PrfA. Da PrfA_{G145S} eine stärkere DNA-Bindung aufweist als PrfA_{wt}, bleibt die Hypothese eines sekretierten PrfA-Aktivators, der eine aktivierende Konformationsänderung hervorruft, unwiderlegt. Denkbar wäre, dass der listerielle Inhibitor durch den Wirtszell-Aktivator verdrängt und PrfA dadurch aktiviert würde. Ein Wirts-abhängiger Kofaktor hätte den Vorteil, dass er eine präzise räumliche und zeitliche Aktivierung von PrfA erlauben würde und dadurch den bekannten Aktivierungsmechanismus ergänzen könnte.

3.4 Untersuchungen der PrfA-DNA-Interaktion

3.4.1 Analyse der DNA-Bindung von rekombinantem PrfA

Neben Thermosensor und eventuellem Kofaktor sind auch die Sequenzen der PrfA-Boxen in der Regulation der Virulenzgenexpression in *L. monocytogenes* wichtig. Die Bindungsaffinität von PrfA an PrfA-Boxen korreliert mit der Anzahl der Abweichungen von der optimalen, perfekt palindromischen DNA-Sequenz: je mehr Abweichungen vorhanden sind, desto schwächer bindet PrfA an die DNA. So erkennt PrfA perfekt symmetrische Promotoren wie die von *hly* und *plcA* bereits bei geringeren, die von *mpl*, *actA* und *inlA* hingegen erst bei höheren PrfA-Konzentrationen (Freitag *et al.*, 1993; Freitag & Portnoy, 1994; Sheehan *et al.*, 1995; Bohne *et al.*, 1996; Ripio *et al.*, 1997b). Dieser regulatorische Mechanismus ist offenbar kritisch für die zeitliche und räumliche Regulation der Virulenzgenexpression und folglich für die korrekte, zeitliche Abfolge des Infektionszyklus von *L. monocytogenes*.

Die Bindung von PrfA an DNA wurde bereits früher mittels EMSA und *footprinting*-Studien näher charakterisiert (Freitag *et al.*, 1993; Böckmann *et al.*, 2000; Vega *et al.*, 2004). Die Bindungseigenschaften des in dieser Arbeit rekombinant hergestellten PrfA sollten daher ebenfalls mittels EMSA untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 28 bp untersucht, mit denen jedoch nur eine schwache und diffuse PrfA-DNA-Bande im EMSA erzielt wurde. Bei früheren Untersuchungen wurden längere Oligonukleotide von 97 - 178 bp verwendet (Freitag *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1996; Dickneite *et al.*, 1998), die eine stärkere Komplexierung der DNA bewirkten. In *footprinting*-Studien wurde gezeigt, dass PrfA an eine Position -58 bis -33 relativ zum Transkriptionsstart von *hly* bindet (Dickneite *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998). Das bedeutet, dass PrfA neben der 14 bp langen PrfA-Box auch 10 bp aufwärts und 2 bp abwärts von der PrfA-Box bindet. Daher spielen gegebenenfalls neben der PrfA-Box auch andere Basen eine wichtige Rolle in der PrfA-DNA-Bindung.

Dennoch konnte mittels Gelfiltration gezeigt werden, dass PrfA_{wt} auch mit Oligonukleotiden von 16 bp Länge einen stabilen und festen Komplex bildet (diese Arbeit). Der PrfA-DNA-Komplex eluierte dabei deutlich früher als die Einzelkomponenten, ungebundene DNA bzw. ungebundenes PrfA. Das rekombinant hergestellte PrfA ist damit korrekt gefaltet und bindet DNA.

3.4.2 Bestimmung der DNA-Bindungskonstante von PrfA

Die konstitutiv aktive Mutante PrfA_{G145S} zeigt eine im Vergleich zu PrfA_{wt} stärkere DNA-Bindungsaffinität. In *footprinting*-Studien genügte eine 6 - 7 fach geringere Menge an PrfA_{G145S}, um den gleichen Schutz der DNA zu erreichen wie beim PrfA_{wt} (Vega *et al.*, 1998). Transkriptionsassays *in vitro* zeigten, dass der Promotor für *actA* 9 fach und der Promotor für *plcA* 2 fach stärker von PrfA_{G145S} induziert wurde als PrfA_{wt}. Allerdings ergeben indirekte Messtechniken wie EMSA oder *in vitro*-Transkriptionsassays eher ungenaue Bindungskonstanten. Quantitative Bindungsaffinitäten für DNA von PrfA wurden daher in dieser Arbeit durch Bindungsstudien mittels SPR bestimmt, bei der die Bindung von PrfA an DNA direkt verfolgt werden kann. Die DNA-Bindungsanalysen ergaben für PrfA_{wt} und den *hly*-Promotor eine Bindungskonstante von $(9 \pm 1) \cdot 10^{-7}$ M. Für PrfA_{G145S} lag diese bei $(5 \pm 1) \cdot 10^{-8}$ M.

Die Bindungsaffinität von apo-Cap für seine spezifische DNA liegt unter $1 \cdot 10^{-5}$ M, da sie mittels Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen nicht gemessen werden konnte. Durch cAMP-induzierte Konformationsänderungen steigt die Bindungskonstante von Cap für eine optimierte DNA-Sequenz hingegen auf $(6.3 \pm 0.9) \cdot 10^{-9}$ M (Dai *et al.*, 2004). Bei CooA sind die Bindungskonstanten, die ebenfalls mittels Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen gemessen wurden, denen des Cap vergleichbar: geringer als $1 \cdot 10^{-5}$ in Abwesenheit von CO, $8 \cdot 10^{-9}$ M in Anwesenheit von CO (Youn *et al.*, 2005). PrfA_{wt} hingegen erkennt DNA auch ohne einen Kofaktor. Die Bindungsaffinität ist dabei um rund zwei Größenordnungen geringer als die des Cap/cAMP. Die Affinitätskonstante von PrfA_{G145S} hingegen nähert sich der des Cap/cAMP. Die strukturelle Ordnung des HTH-Motivs erhöht vermutlich die DNA-Bindungsaffinität signifikant. Die Bindungsaffinitäten konstitutiv aktiver Mutanten von Cap ohne cAMP an DNA sind darüber hinaus immer geringer als die des Cap/cAMP. Folglich könnte ein Kofaktor die DNA-Bindungsaffinität von PrfA_{wt} über die von PrfA_{G145S} auf einen zu Cap/cAMP vergleichbaren Wert erhöhen.

Da für die DNA-Bindungsstudien von PrfA und Cap grundsätzlich unterschiedliche Methoden eingesetzt wurden, sind systematische Unterschiede zu erwarten, so dass die Bindungskonstanten von PrfA und Cap nicht in ihren Absolutwerten verglichen werden können.

3.4.3 PrfA-DNA-Kristallisation

Wie für PrfA wurde auch für Cap, das an über 22 verschiedene Operons bindet, eine sequenzabhängige Bindungsaffinität vermutet (Ebright *et al.*, 1989). Die Kristallstruktur des Cap-DNA-Komplexes zeigt, dass die Bindung von Cap an die Ziel-DNA vorwiegend über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nukleotiden und Aminosäuren des Cap erfolgt (Schultz *et al.*, 1991; Parkinson *et al.*, 1996; Lawson *et al.*, 2004).

Um festzustellen, welche Aminosäuren von PrfA mit welchen Nukleotiden der PrfA-Box interagieren, sollte daher in dieser Arbeit die Struktur des PrfA-DNA-Komplexes gelöst werden. Für die Kristallisation von Protein-DNA-Komplexen ist neben der Sequenz die Oligonukleotidlänge sowie die Größe und Art der 5'- bzw. 3'-Überhänge entscheidend. Häufig lagern sich die Oligonukleotide mit ihren überstehenden und komplementären Enden aneinander und bilden im Kristall pseudokontinuierliche DNA-Helices aus (Joachimiak *et al.*, 1987; Wolberger *et al.*, 1988).

Die Bindung von PrfA an eine spezifische DNA-Sequenz wurde sowohl in dieser Arbeit als auch in der Literatur eingehend untersucht (Dickneite *et al.*, 1998; Vega *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000). Um die optimale Länge der Oligonukleotide für die Kristallisation zu ermitteln, wurde diese ausgehend von den 14 bp der PrfA-Box systematisch auf 40 bp verlängert. Auch die Art der Überhänge wurde variiert: stumpfe Enden, 5'-Basenüberhänge und 3'-Basenüberhänge wurden erprobt. Eine Vielzahl an PrfA-DNA-Kristallen konnte dadurch hergestellt werden, die jedoch lediglich Röntgenstrahlen bis maximal 9 Å beugten. Prinzipiell ist die Reinheit der Einzelkomponenten für die Kristallisation entscheidend. Das Protein (PrfA_{wt} und PrfA_{G145S}) konnte in hoher Reinheit produziert werden. Die verwendeten Oligonukleotide wurden mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC) gereinigt. Das Prinzip dieser Reinigungsmethode liegt darin, dass die bei der Synthese von Oligonukleotiden entstandenen kürzeren Nebenprodukte weniger stark geladen sind und somit mittels IEC abzutrennen sind. Allerdings nimmt der Ladungsunterschied zum nächst kürzeren Synthesenebenprodukt bei wachsender Oligonukleotidlänge sehr schnell ab. Die Reinigung von über 20 bp langen Oligonukleotiden ist daher problematisch. Folglich wurden bei längeren Oligonukleotiden Umkehrphasen-HPLC-gereinigte Oligonukleotide verwendet, um auszuschließen, dass die schlechte Beugung der Kristalle durch heterogene DNA verursacht wird. Durch Kombination von HPLC- und PAGE-Reinigung

der Oligonukleotide konnte zum Beispiel eine bessere Röntgenbeugung der Protein-DNA-Kristalle erzielt werden als bei der Verwendung von nur durch PAGE gereinigten Oligonukleotiden. Die Reinheit der DNA spielt daher eine große Rolle bei der Streuung von Kristallen (Jordan *et al.*, 1985).

Durch Optimierung der Kristallisationsbedingungen konnten schließlich Kristalle mit verbessertem Streuvermögen erzeugt werden. Mit einem PrfA_{G145S}_16T-Kristall wurde am Synchrotron in Hamburg ein guter Datensatz gemessen. Dieser lieferte bisher jedoch mittels Molekularem Ersatz noch keine Lösung. Dies könnte ein möglicher Hinweis darauf sein, dass systematische Konformationsänderungen in PrfA nach DNA-Bindung stattfinden, die sich über das gesamte Protein erstrecken und somit PrfA_{G145S} nicht mehr als Suchmodell eingesetzt werden kann. Durch DNA-Bindung ausgelöste Konformationsänderungen konnten zum Beispiel bei Mtn (multidrug transporter activation protein) der MerR-Familie beobachtet werden, das ebenfalls ein winged HTH-Motiv besitzt (Godsey *et al.*, 2001). Auch für Cap sind ähnliche Änderungen bei DNA-Bindung beschrieben worden (Schultz *et al.*, 1991).

Kristalle von PrfA_{wt} und dem 34 bp langen Oligonukleotid 15b_17 beugten Röntgenstrahlen gegenwärtig nur bis 7 Å. Laut Berechnung des Matthews-Koeffizienten könnte es sich hierbei um einen PrfA-DNA-Komplex handeln.

Zur Verbesserung der Beugung der Kristalle könnten Kristallisationsmethoden wie *microseeding* und *streakseeding* durchgeführt sowie zusätzlich Additive wie n-Octyl-β-glucopyranosid oder Spermidin zum Kristallisationsansatz zugegeben werden, die bei den Cap-DNA-Kristallen eine Verbesserung der Beugung bewirkten (Schultz *et al.*, 1990). Durch die Verwendung von 5-Bromo- oder 5-Iodouracil anstelle von Thymidin in den Oligonukleotiden könnte die Strukturlösung mittels Multiplem Isomorphen Ersatz unternommen werden.

3.5 Substratspezifität von C3stau2

3.5.1 Die ARTT-Schleife als Substraterkennungsmotiv?

Bakterielle Toxine ADP-ribosylieren unterschiedliche eukaryotische Zielproteine. Das Diphtherie-Toxin und das Exotoxin A inaktivieren die Proteinsynthese in humanen Wirtszellen durch ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2. Das Cholera-Toxin, das Pertussis-Toxin und das Hitzeempfindliche Enterotoxin beeinflussen die Signaltransduktionskette durch Modifizierung regulatorischer G-Proteine. Die Mitglieder der binären Toxinfamilie, VIP2, C2 und das Iota-Toxin, ADP-ribosylieren ein spezifisches Arginin (Arg177) des Aktins und inhibieren somit die Aktin-Polymerisation. Die C3-Exoenzyme dagegen modifizieren ein Asparagin der Rho GTPasen und greifen dadurch in den Mechanismus der Rho GTPase-vermittelten Signaltransduktion ein. C3bot1 ADP-ribosyliert nur RhoA, -B und -C, während C3stau2 zusätzlich RhoE und Rnd3 modifiziert (Tabelle 2, S. 23). Obwohl diese prokaryotischen ADP-RT verschiedene Zielproteine modifizieren und eine niedrige Aminosäuresequenz-Homologie teilen, besitzen sie eine ähnliche, konservierte NAD-Bindungstasche mit einem katalytischen Glutamat und möglicherweise einen ähnlichen katalytischen Mechanismus. Durch den Vergleich der in dieser Arbeit gelösten dreidimensionalen Struktur von C3stau2 mit C3bot1, dem Hauptrepräsentanten der C3-ähnlichen ADP-RT, konnte die Einordnung in die Familie der C3-Exoenzyme eindeutig bestätigt werden. Um herauszufinden, welche Strukturelemente für die Substratspezifität verantwortlich sind, wurden die Strukturen der C3-Exoenzyme mit den Strukturen der binären Toxine VIP2 aus *B. cereus* und das Iota-Toxin aus *C. perfringens* durch Superposition verglichen (Abbildung 39). Trotz der unterschiedlichen Zielproteine ist die strukturelle Homologie zwischen den ADP-RT-Familien deutlich zu erkennen. Das ARTT-Motiv zwischen den β -Strängen $\beta 5$ und $\beta 6$ dieser Proteine (in unmittelbarer Nähe zum NAD) deutet auf ein spezifisches Substraterkennungsmotiv für die ADP-Ribosylierung hin. Im ARTT-Motiv beider ADP-RT-Klassen befindet sich ein aromatischer Rest (Phe oder Tyr), der potentiell an der Substratbindung beteiligt ist (Tabelle 11). Der Austausch von Tyr173 in C3stau2 gegen Alanin oder Lysin unterbindet die Bindung an RhoA (Wilde *et al.*, 2002b). Ebenso zeigt die Mutation des homologen Phenylalanins (Phe209) in C3bot1 zu Alanin, dass Phe209 an der Substratbindung beteiligt ist (Wilde *et al.*, 2002a).

Zusätzlich ist Asn41 in RhoA von einem hydrophoben Bereich aus zwei Valinen (Val38, Val43), einem Tryptophan (Trp58) und einem Phenylalanin (Phe39) umgeben (Ihara *et al.*, 1998). Mutationen von Val43 zu Serin oder von Trp58 zu einer nichtaromatischen Aminosäure in RhoA inhibierten die ADP-Ribosylierung (Wilde *et al.*, 2000). Daher wird angenommen, dass die aromatische Aminosäure des ARTT-Motivs der binären und C3-ähnlichen ADP-RT hydrophobe Wechselwirkungen mit ihrem Substrat eingehen kann (Han *et al.*, 2001; Ihara *et al.*, 1998). Die Erkennung der hydrophoben Aminosäure ist jedoch offensichtlich nicht substratspezifisch, da die binären und C3-ähnlichen ADP-RT unterschiedliche Substrate modifizieren und dennoch eine homologe, aromatische Aminosäure im ARTT-Motiv besitzen.

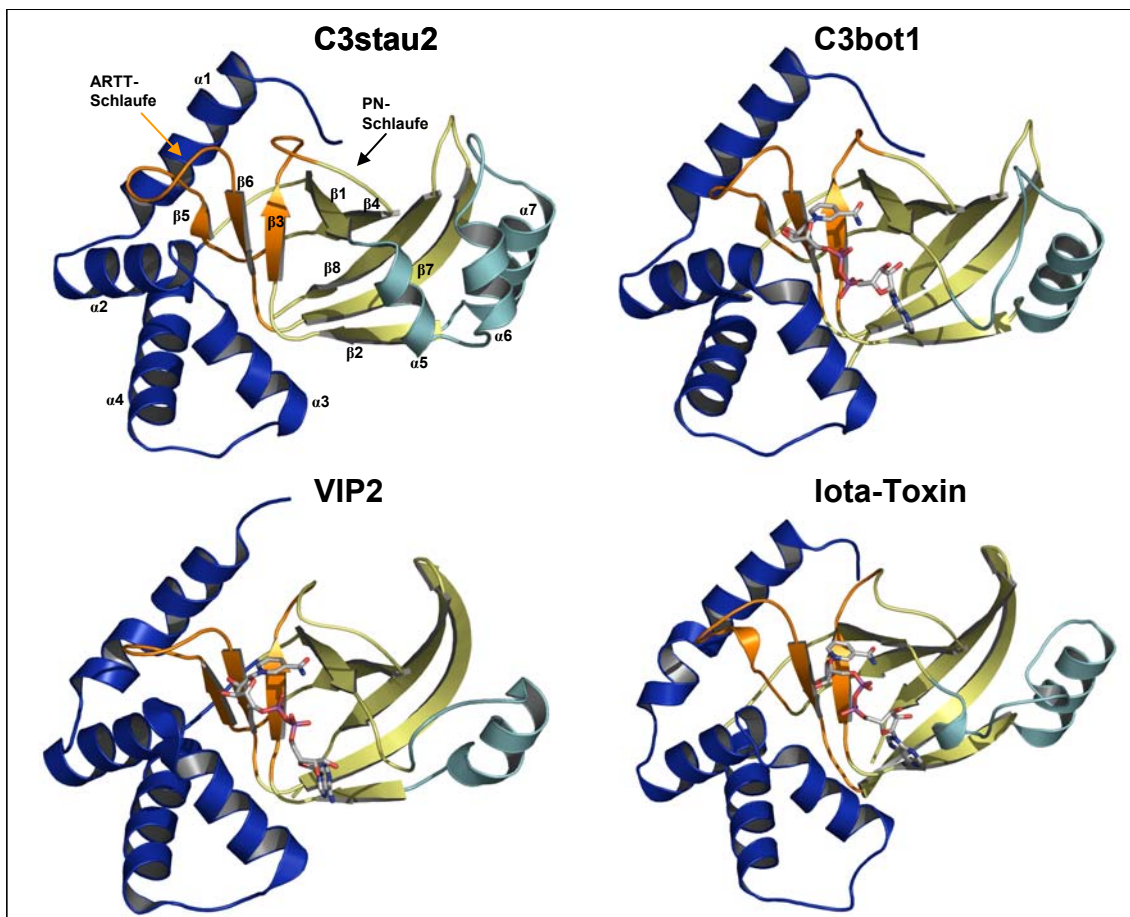


Abbildung 39: Strukturvergleich der binären ADP-RT mit den C3-Exoenzymen.

Die vier ADP-RT sind in gleicher Orientierung und mit den entsprechenden Farben aus Abbildung 28 (S. 65) dargestellt. Für VIP2 (PDB-ID 1QS2) und das Iota-Toxin (PDB-ID 1GIQ) wird jeweils die C-terminale Domäne gezeigt, die die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität besitzt. NAD ist in den Strukturen als Stäbchen-Präsentation dargestellt.

Ein konserviertes Glutamin (Gln178 in C3stau2) in der ARTT-Schleife der C3-ähnlichen ADP-RT ist ebenfalls für die ADP-Ribosylierung von

Bedeutung. Mutationsstudien zeigen, dass es für den ADP-Ribose-Transfer, jedoch nicht für die Bindung an RhoA notwendig ist (Wilde *et al.*, 2002b). Möglich wäre, dass Glutamin Wasserstoffbrücken zur Carbonyl- oder Amidgruppe des Asn41 von RhoA ausbildet. Bei den binären Toxinen ist das Glutamin durch ein konserviertes Glutamat ersetzt, das eine Salzbrücke zu Arg177 des Aktins bilden könnte (Han *et al.*, 1999). Das Glutamat ist in allen Aktin-modifizierenden Toxinen konserviert, während die C3-ähnlichen Exoenzyme ein Glutamin besitzen. Für die substraterweiterte Spezifität von C3stau2 scheint es jedoch keine Rolle zu spielen.

Tabelle 11: Sequenzvergleich der ARTT-Motive verschiedener ADP-RT. Identische Aminosäuren sind in rot und homologe Aminosäuren in blau gekennzeichnet.

ADP-RT	β5-ARTT-Schleife-β6
C3stau2	AYIDSKELTAYPGQQEVL ^{rot} LLP
C3cer	AYMMSDDLTA ^{blau} YPGQYEL ^{rot} LLP
C3bot1	GYIDP--ISA ^{blau} FAGQLE ^{rot} M ^{blau} LLP
C3lim	GYIEP--ISTF ^{blau} KGQLE ^{rot} V ^{blau} LLP
VIP2	AYLSA--IGGF ^{blau} ASEKE ^{rot} ILLD
Iota-Toxin	AYLSA--IPGYAGEY ^{rot} EVL ^{rot} LN
C2	AFIYG--FSGFQDEQE ^{rot} ILLN

Die in dieser Arbeit vorgestellte Struktur von C3stau2 zeigt, dass die ARTT-Schleife auch in Abwesenheit von NAD bereits die Konformation des NAD-gebundenen C3bot1 aufweist. Bei C3bot1 wird diese Konformation durch die Verschiebung der ARTT-Schleife und weiterer Aminosäuren (Phe209 und Gln212) in Richtung der NAD-Bindungstasche durch NAD ausgelöst (Menetrey *et al.*, 2002). Bei C3stau2 sind auch einige Aminosäureseitenketten (Tyr173 und Gln178) trotz Abwesenheit von NAD in Richtung der NAD-Bindungstasche ausgerichtet. In Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* verursacht TAD, ein NAD-Analogon, eine Konformationsänderung der ARTT-Schleife (Li *et al.*, 1996). Die ARTT-Schleife besitzt daher die Fähigkeit, sich an das jeweilige Substrat des Toxins anzupassen.

Die kürzlich veröffentlichte Struktur des C3bot1-RalA-Komplexes unterstreicht die Bedeutung der ARTT-Schleife bei der Substraterkennung (Holbourn *et al.*, 2005) (Abbildung 40). C3bot1 bindet RalA, eine Ras-verwandte GTPase, und verhindert dadurch den Transfer der ADP-Ribose auf RhoA, während gleichzeitig die NAD-Glycohydrolase-Aktivität zunimmt (Wilde *et al.*, 2002a). C3stau2 hingegen wird von RalA nicht erkannt und seine

ADP-Ribosylierungs-Aktivität folglich auch nicht beeinflusst. Die Struktur des C3bot1-RalA-Komplexes zeigt nun, dass die α -Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie die ARTT-Schleife von C3bot1 an der RalA-Bindung beteiligt sind.

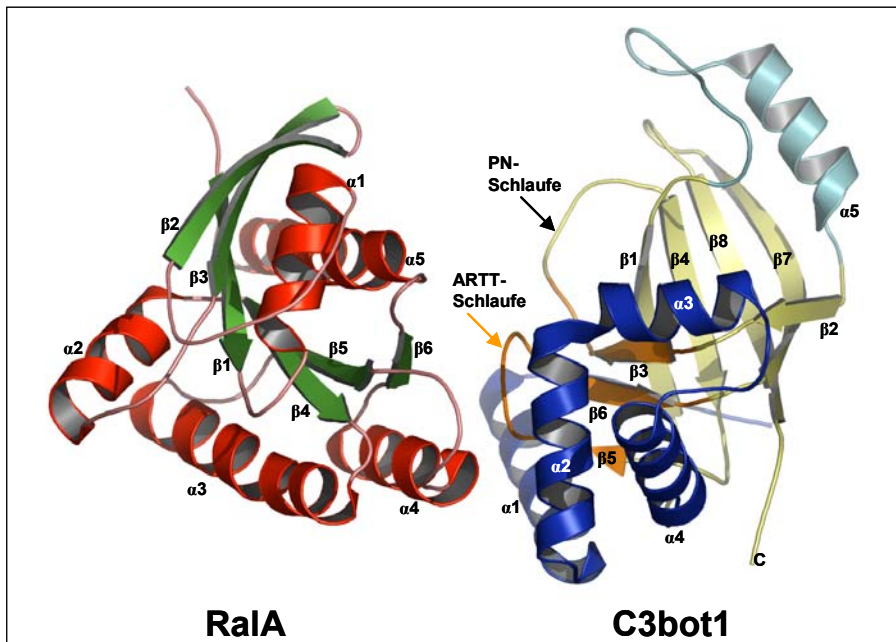


Abbildung 40: Struktur des C3bot1-RalA-Komplexes (PDB-ID 1WCA).

C3bot1 ist mit den entsprechenden Farben aus Abbildung 28 (S. 65) dargestellt. In RalA wurden die α -Helices in rot und die β -Faltblätter in grün dargestellt. Die Kontaktfläche zwischen den beiden Proteinen wird von $\alpha 4$ und $\beta 6$ von RalA und von $\alpha 1$, $\alpha 2$ und der ARTT-Schleife von C3bot1 gebildet.

Der Vergleich des C3bot1-RalA-Komplexes mit ungebundenem C3bot1 zeigt, dass die RalA-Bindung erhebliche Konformationsänderungen in der ARTT-Schleife auslöst. Die Abweichung vergleichbarer C_{α} -Atompositionen der ARTT-Schleife von RalA-gebundenem C3bot1 und nativem C3bot1 beträgt 2.9 Å. Im C3bot1-RalA-Komplex zeigt die Hydroxylgruppe von Ser207 in C3bot1 in Richtung der NAD-Bindungstasche und ermöglicht dadurch eine Wasserstoffbrücke zwischen seinem Carbonyl-Sauerstoff und Lys143 von RalA (Abbildung 41A). Auch Asp204, ebenfalls in der ARTT-Schleife von C3bot1 lokalisiert, bindet Lys143 aus RalA über eine Wasserstoffbrücke. Zudem rotiert Phe209 aus der oberflächenexponierten Position heraus und ist nicht am Kontakt zu RalA beteiligt. Dies erklärt, warum der Austausch von Phe209 zu Alanin die RalA-Bindung nicht inhibierte (Wilde *et al.*, 2002a).

Die Überlagerung von C3stau2 und RalA-gebundenem C3bot1 lässt erkennen, warum RalA C3stau2 nicht bindet (Abbildung 41B). Die ARTT-Schleife in C3stau2 ist im Vergleich zu C3bot1 um zwei Aminosäuren (Lys168 und Glu169) länger. Diese Aminosäuren dehnen möglicherweise die ARTT-

Schleife in Richtung der RalA Interaktionsfläche aus und verhindern dabei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thr171 bzw. Asp166 (Ser207 und Asp204 in C3bot1) und Lys143 in RalA.

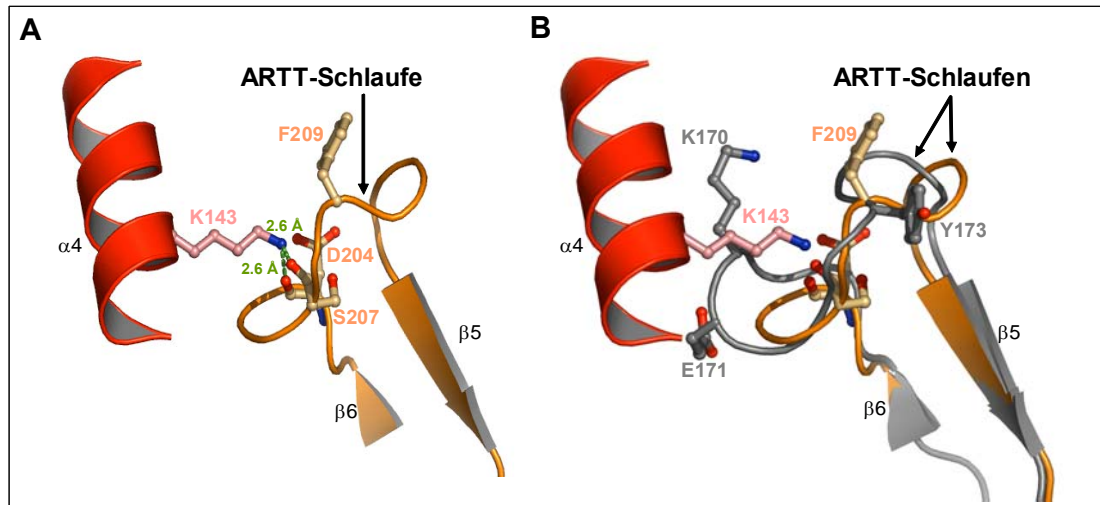


Abbildung 41: Darstellung einiger Wechselwirkungen zwischen RalA und C3bot1.

In A) sind die Wechselwirkungen zwischen der α -Helix $\alpha 4$ von RalA (rot) und der ARTT-Schleife von C3bot1 (orange) gezeigt. Wichtige Aminosäuren sind als Kugel-Stab-Präsentation hervorgehoben. Wasserstoffbrücken sind als grüne, gepunktete Linien eingezeichnet. In B) sind zusätzlich die überlagerte ARTT-Schleife sowie einige wichtige Aminosäuren von C3stau2 (grau) dargestellt.

Auch C3cer, eine C3-ähnliche ADP-RT aus *Bacillus cereus*, besitzt eine durch zwei Aminosäuren verlängerte ARTT-Schleife und bindet dennoch an RalA (Wilde *et al.*, 2002a). Jedoch wird die ADP-RT-Aktivität von C3cer im Vergleich zu C3bot1 nur zu 24 % von RalA inhibiert. Die zusätzlichen Aminosäuren sind bei C3cer zwei Aspartate, die kleiner als Lysin bzw. Glutamat in C3stau2 sind und dadurch die Interaktion mit RalA vermutlich nicht vollständig verhindern können. Die Struktur eines C3cer-RalA-Komplexes könnte die durch RalA nur gering verminderte ADP-RT-Aktivität von C3cer im Detail erklären.

3.5.2 Andere Substraterkennungsmotive in C3stau2?

Um zu untersuchen, ob elektrostatische Wechselwirkungen für die Substrat-Bindung der ADP-RT wichtig sind, wurden die elektrostatischen Potentiale der Oberflächen von C3stau2 und C3bot1 berechnet (Abbildung 42). Diese weisen jedoch bei beiden C3-Exoenzymen eher ungeladene Aminosäuren auf, so dass elektrostatische Wechselwirkungen keine besondere Rolle bei der RhoA-Erkennung bzw. -Bindung spielen werden.

In den Oberflächen von C3stau2 und C3bot1 ist die NAD-Bindungstasche deutlich als Einkerbung zu erkennen (Abbildung 42). Dabei zeigt das Nikotinamid des NAD in Richtung der ARTT-Schleife, während der Adenosin-Anteil von NAD zum offenen Ende weist. Die Spaltung der ADP-Ribose von dem NAD erfolgt an der N-glykosidischen Bindung zwischen dem Nikotinamid und der Ribose (Abbildung 42, gelber Stern). Für den Transfer der ADP-Ribose auf das RhoA könnten daher die mit einem schwarzen Kreis markierten Flächen bei den Oberflächen der C3-Exoenzyme potentielle Toxin-Substrat-Kontaktflächen darstellen (Abbildung 42). An dieser Kontaktfläche sind neben dem ARTT-Motiv auch die PN-Schleife sowie die α -Helix $\alpha 3$ beteiligt und somit möglicherweise für die Substraterkennung wichtig.

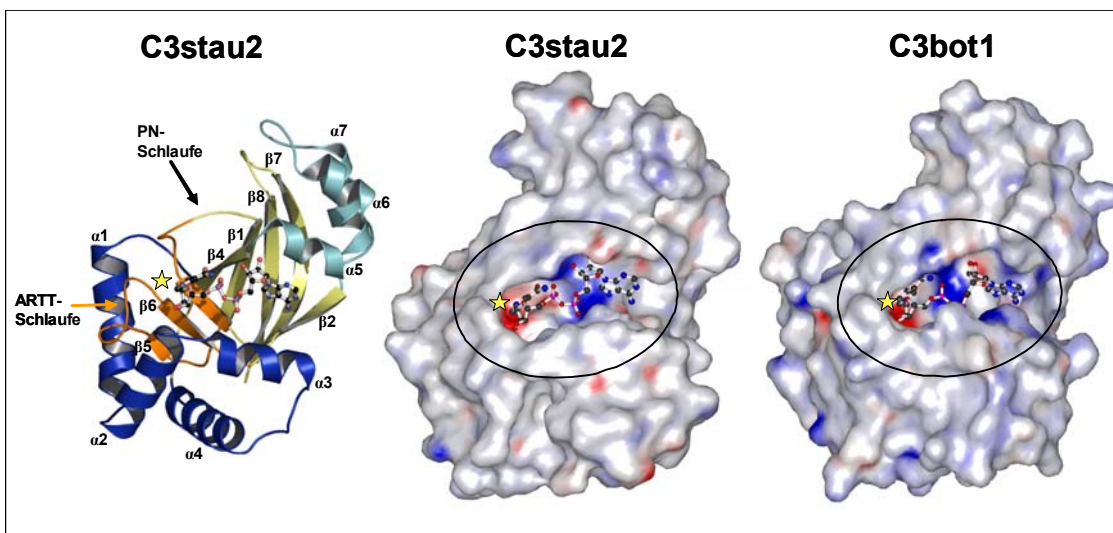


Abbildung 42: Elektrostatisches Potential der Oberflächen von C3stau2 und C3bot1.

Das Bändermodell von C3stau2 als auch die dazugehörige Oberfläche und die Oberfläche von C3bot1 (PDB-ID 1GZF) sind in gleicher Orientierung dargestellt. Das elektrostatische Oberflächenpotential der einzelnen Moleküle wurde mit dem Programm *GRASP* berechnet. Die potentielle Toxin-Substrat-Kontaktfläche ist durch einen schwarzen Kreis markiert. NAD ist als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die Spaltungsstelle im NAD ist mit einem gelben Stern markiert.

Eine Beteiligung der α -Helix $\alpha 3$ an der Substraterkennung wurde bereits für das Iota-Toxin beschrieben (Tsuge *et al.*, 2003). Mutationsstudien an Asn255 in $\alpha 3$ des Iota-Toxins zeigten, dass $\alpha 3$ einen entscheidenden Einfluss auf die ADP-RT-Aktivität nimmt. Interessanterweise beträgt die durchschnittliche Abweichung der C_{α} -Atompositionen von $\alpha 3$ zwischen VIP2 und dem Iota-Toxin, die beide das gleiche Substrat modifizieren, nur 0.3 Å. Zwischen C3stau2 und C3bot1, die leicht unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen, beträgt sie hingegen 1.2 Å. Denkbar wäre, dass $\alpha 3$ wie beim Iota-Toxin auch

bei den C3-ähnlichen ADP-RT an der Substraterkennung beteiligt ist und zu der erweiterten Substratspezifität von C3stau2 führt.

Zwei nicht in die Klassen der prokaryotischen ADP-RT einzuordnende Toxine sind die Exoenzyme S (ExoS) und T (ExoT) aus *Pseudomonas aeruginosa* (Barbieri & Sun, 2004). Sie sind bifunktionale Cytotoxine mit zwei unabhängigen Enzymaktivitäten. Die N-terminale Domäne besitzt eine GAP-Aktivität, während die C-terminale Domäne eine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität aufweist. Das Strukturmodell der ADP-Ribosyltransferase-Domäne von ExoS und ExoT wurde vor kurzem veröffentlicht (Sun *et al.*, 2004). Interessanterweise beträgt die Aminosäuresequenzidentität beider Enzyme 76 %, dennoch ADP-ribosylieren sie unterschiedliche Substrate. Durch Mutationsstudien konnten die für die Substratspezifität verantwortlichen Regionen definiert werden. Es stellte sich heraus, dass neben dem ARTT-Motiv und der PN-Schleife auch der *active site loop*, der α -Helix $\alpha 3$ bei den C3-ähnlichen ADP-RT entspricht, für die Substraterkennung verantwortlich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Struktur von C3stau2 Hinweise auf die erweiterte Substratspezifität liefert. Sowohl die hohe Flexibilität als auch die Verlängerung der ARTT-Schleife deuten auf eine Funktion dieser Schleife in der Substraterkennung hin. Ebenso könnte $\alpha 3$, das in räumlicher Nähe zur NAD-Bindungstasche liegt, an der Substraterkennung beteiligt sein. Um diese Hypothesen zu bestätigen, müssten zum einen Mutationsstudien durchgeführt werden und zum anderen eine Komplex-Struktur von C3stau2 mit den jeweiligen Substraten RhoA und RhoE gelöst werden.

3.6 C3stau2-RhoA-Interaktion

Eine Kristallstruktur des Komplexes aus C3stau2 und RhoA wäre überaus nützlich, um Aussagen über den Mechanismus der ADP-Ribosylierung und die Bereiche der Substraterkennung treffen zu können. Bisher konnte jedoch kein ADP-RT-Substrat-Komplex kristallisiert werden, so dass über den genauen Mechanismus der ADP-Ribosylierung nur spekuliert werden kann.

Eine Vielzahl an Komplex-Strukturen von RhoA sind jedoch bereits gelöst worden: mit einem *guanine nucleotide dissociation inhibitor* (GDI) (Longenecker *et al.*, 1999), mit Dbs, einem Rho-spezifischen Guaninnukleotid-freisetzenden Protein (Snyder *et al.*, 2002), einem GTPase-aktivierenden Protein (Rittinger *et al.*, 1997) sowie mit zwei Rho-spezifischen Proteinkinasen, ROCK (Dvorsky *et al.*, 2004) und PKN α (Maesaki *et al.*, 1999). Dabei wurde festgestellt, dass trotz struktureller Unterschiede der Substrate die Bindung jeweils an der *switch* I oder *switch* II Region von RhoA stattfindet. Interessanterweise befindet sich Asn41, das von den C3-Exoenzymen ADP-ribosyliert wird, in unmittelbarer Nähe zu *switch* I in RhoA. Im Gegensatz zu diesen RhoA-Substraten binden die C3-ähnlichen ADP-RT RhoA nur transient, um letzteres zu modifizieren, und dissoziieren anschließend. Es wird folglich kein stabiler Toxin-Substrat-Komplex gebildet. Dadurch erklärt sich, warum bisher RhoA mit keinem RhoA-modifizierenden Enzym eines bakteriellen Pathogens kokristallisiert und dessen Struktur aufgeklärt werden konnte.

Die Kristallisation eines Protein-Protein-Komplexes wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Flexible Elemente und uneinheitliche Proteinkonformationen stören bei der Kristallisation die geordnete Anlagerung und verhindern die Kristallkeimbildung. Die Einzelkomponenten des C3stau2-RhoA-Komplexes konnten jeweils in hoher Reinheit produziert werden. Um eine homogene Komplex-Population zu erhalten, musste jedoch die Enzymreaktion zwischen C3stau2 und RhoA unterbunden und ein stabiler Komplex gebildet werden. Dafür wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt: die Zugabe eines NAD-Analogons, das nicht hydrolysiert sowie eine RhoA-Mutante, die nicht ADP-ribosyliert werden konnte. Leider zeigte sowohl die Gelfiltration als auch die SPR keinen stabilen C3stau2-RhoA-Komplex.

4 Zusammenfassung

4.1 *PrfA* aus *L. monocytogenes*

Das Überleben humanpathogener Listerien in Wirtsorganismen wird durch Virulenzgene gesichert, deren Expression zeitlich und räumlich -sofern bekannt- von einem einzigen Transkriptionsfaktor PrfA reguliert wird. Hyperhämolytische Laborstämme von *L. monocytogenes* exprimieren eine konstitutiv aktive PrfA-Mutante (PrfA_{G145S}), die die Virulenzgenexpression unabhängig von Umweltbedingungen dauerhaft induziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Struktur von PrfA erfolgreich gelöst und eindeutig in die Crp/Fnr-Familie der bakteriellen Transkriptionsfaktoren eingeordnet werden. Durch den strukturellen Vergleich von Wildtyp-PrfA (PrfA_{wt}) mit der konstitutiv aktiven Mutante PrfA_{G145S} konnte gezeigt werden, dass ein einziger Aminosäureaustausch dramatische strukturelle Änderungen in PrfA auslöst, die zur Stabilisierung und Neuorientierung des HTH-Motivs führen. Das HTH-Motiv von PrfA_{G145S} nimmt dabei eine Konformation an, die dem des cAMP-induzierten, insbesondere dem des DNA-gebundenen Cap entspricht. Dies legt die Vermutung nahe, dass PrfA wie Cap einer Kofaktor-induzierten Aktivierung unterliegt. Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit durch die Detektion eines Tunnels in der PrfA-Struktur unterstützt werden, der einen kleinen, teilweise hydrophoben Effektor als putativen Kofaktor binden könnte. Die Identifikation eines Kofaktors sowie dessen Kokristallisation mit PrfA könnten weitere Details in dem Aktivierungsmechanismus von PrfA liefern.

Mittels Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie konnte in dieser Arbeit eine 18-fach schwächere DNA-Bindungsaffinität für PrfA_{wt} im Vergleich zu PrfA_{G145S} ermittelt werden, die mit der strukturellen Konformationsänderung des HTH-Motivs im Einklang stehen könnte. Zur detaillierten Analyse der Interaktion von PrfA mit DNA wurden Kokristallisationsversuche von PrfA mit unterschiedlichen Oligonukleotiden durchgeführt. Hierbei konnten erfolgreich Kristalle erzeugt werden. Die Strukturlösung war jedoch nicht möglich, da das Röntgenbeugungsvermögen der Kristalle für eine mittlere bis höhere Auflösung nicht ausreichte. Zunächst müsste allerdings sichergestellt werden, dass die Kristalle den PrfA-DNA-Komplex enthalten. Desweiteren könnte eine noch stringenter Reinigung des PrfA-DNA-Komplexes oder die

Zugabe von Additiven bei der Kristallisation die Kristallqualität soweit verbessern, dass die Kristalle Röntgenstrahlen zu höherer Auflösung beugen.

4.2 *C3stau2* aus *S. aureus*

Die ADP-Ribosylierung regulatorischer Proteine durch bakterielle ADP-Ribosyltransferasen ist ein wichtiger Prozess, durch den diese pathogenen Organismen Einfluss auf zelluläre Prozesse des eukaryotischen Wirts nehmen. Neben zahlreichen weiteren Virulenzfaktoren produziert *Staphylococcus aureus* das Exoenzym C3stau2, das zur Familie der C3-ähnlichen ADP-Ribosyltransferasen (ADP-RT) gehört. Im Gegensatz zu C3bot1, dem Hauptrepräsentanten dieser C3-ähnlichen ADP-RT aus *C. botulinum*, ADP-ribosyliert C3stau2 neben RhoA, -B und -C auch RhoE und Rnd3. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Struktur von C3stau2 erfolgreich gelöst und mit der bereits bekannten Struktur von C3bot1 verglichen werden. Dabei stellte sich heraus, dass C3stau2 zwei zusätzliche α -Helices sowie eine veränderte Konformation der für die Substraterkennung wichtigen ARTT-Schleife aufweist. Die Konformation dieser neuorientierten ARTT-Schleife ähnelt dabei der Schleife des NAD-bindenden C3bot1. Neben der flexiblen ARTT-Schleife könnte auch die α -Helix α_3 , die in unmittelbarer Nähe zur NAD-Bindungstasche positioniert ist, wichtig für die Substratspezifität der C3-ähnlichen ADP-RT sein. Strukturbasierte Mutationen mit anschließenden Bindungsstudien wären geeignet, die Substraterkennungsdomänen näher einzugrenzen.

Um die erweiterte Substratspezifität von C3stau2 im Detail untersuchen zu können, sollte der Komplex aus C3stau2 und RhoA kristallisiert und strukturell aufgeklärt werden. Jedoch weder die Verwendung eines mutierten RhoA noch die eines NAD-Analogons konnten einen stabilen Komplex induzieren. Entsprechend konnten keine Kristalle des C3stau2-RhoA-Komplexes im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Herstellerfirmen der verwendeten Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Aldrich, Difco, Emerald Biostructures, Fluka, Gerbu, Hampton Research, Invitrogen, Jena Bioscience, Merck, MilliPore, Pharmacia, Qiagen, Riedel-de Haen, Roche, Roth, Sigma und Stratagene. Dabei entsprach der Reinheitsgrad der Chemikalien dem Qualitätsstandard „*pro analysis*, p.a.“.

Die Herstellung des in dieser Arbeit verwendeten deionisierten Wassers erfolgte mit einer Milli-Q Anlage der Firma MilliPore.

5.1.2 Bakterienstämme

In der Tabelle 12 sind die verschiedenen *E. coli*-Stämme, die als Expressionssysteme verwendet wurden, mit ihren unterschiedlichen Genotypen sowie deren Hersteller angegeben.

Tabelle 12: Genotypen und Hersteller der Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> BL21-Codon Plus(DE3)-RIL	<i>E. coli B F⁻ ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> M15	<i>nal^S str^S rif^S thi⁻ lac⁻ ara⁻ gal⁺ mtl⁻ f⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i>	Qiagen
<i>E. coli</i> TG2	<i>supE hsdD5 thiD (lac-proAB) (srl-recA) 306::Tn10 (tet^r) / F'(traD36 proAB lacI lacZ M15)</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F⁻ mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lac ZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q Z ΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene

5.1.3 Plasmide

Zur Produktion der Zielproteine in *E. coli* wurden die in Tabelle 13 aufgelisteten Plasmide transformiert.

Tabelle 13: Eigenschaften der verwendeten Plasmide und ihre Herkunft.

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pGEX-6P1-PrfA	tac Promotor, lac Repressorgen, Prescission-Protease-Gen, Ampicillin-Resistenz; PrfA in <i>multiple cloning site</i> (MCS) kloniert	T. Chakraborty, Giessen
pGEX-2TGL-RhoA _{wt} /RhoA _{N41S}	RhoA in pGEX-2T mit Thrombin-Schnittstelle und Polyglycin-Linker (GL) kloniert	I. Just, Hannover
pQE30	starker T5 Promotor, lac Operator Repressionsmodul, 6 x His-Anker kodierende Sequenz, Ampicillin-Resistenz, synthetische Ribosomenbindestelle	Qiagen
pQE30-PrfA _{wt} /PrfA _{G145S}	PrfA über <i>Bam</i> HI und <i>Pst</i> I in pQE30 kloniert	diese Arbeit
pREP4	lac Repressorgen, Kanamycin-Resistenz	Qiagen

5.1.4 Oligonukleotide

Die für Klonierungs- und Kristallisationsansätze und Protein-DNA-Wechselwirkungsstudien verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 14, Tabelle 15 und Tabelle 16) wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Wenn nicht anders angegeben, ist der Reinheitsgrad „desalted“.

Tabelle 14: Sequenzen der Oligonukleotide für Klonierungsansätze. G145S-Mutationsstelle ist hervorgehoben.

Nr.	Oligo-Name	Sequenz (5' → 3')
1	5'-PrfA-Neu- <i>Bg</i> II	GAGATCTAACGCTCAAGCAGAAGAATT
2	3'-PrfA-Neu- <i>Pst</i> I	GCTGCAGTCGTACGCGTTCATGAA
3	PrfA-G145S-F	GGAAGCTTGGCTCTATTTGCT TCT CAACTTTTAATCCTGACC
4	PrfA-G145S-R	GGTCAGGATTAAAAGTTGAG AG CAAATAGAGCCAAGCTTCC

Tabelle 15: Sequenzen der Oligonukleotide für die Kristallisation sowie deren Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient ϵ bei $\lambda = 260$ nm. Die PrfA-Box ist in rot hervorgehoben.

Nr.	Oligo-Name	Länge (bp)	Sequenz (5' → 3')	Molare Masse (g/mol)	ϵ_{260} (A/ μ mol)
1	14B	14	<u>TTAACATATGTTAA</u>	4261.8	166.8
2	14A	15	A <u>TTAACATATGTTAA</u>	4575.0	182.1
3	14G	17	GC <u>TTAACATATGTTAA</u> G	5209.4	197.8
4	14G2	15	G <u>TTAACATATGTTAA</u>	4591.0	178.6
5	14C	15	C <u>TTAACATATGTTAA</u>	4551.0	174.2
6	14T	15	T <u>TTAACATATGTTAA</u>	4566.0	176.1
7	14TA	16	TA <u>TTAACATATGTTAA</u>	4879.2	191.4

Material und Methoden

8	14CG	16	CG <u>TTAACATATGTTAA</u>	4880.2	186.0
9	16A	17	AA <u>TTAACATATGTTAA</u> T	5192.4	206.7
10	16T	17	TA <u>TTAACATATGTTAA</u> T	5183.4	200.7
11	18C	19	CCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TG	5786.8	218.0
12	18G	19	GCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TG	5826.8	222.4
13	20C	21	CGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGC	6405.2	237.2
14	20G	21	GGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGC	6445.2	241.6
15	22C	23	CGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCC	7023.6	256.4
16	22G	23	GGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCC	7063.6	260.8
17	24A	25	AAGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCCT	7665.0	288.9
18	24T	25	TAGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCCT	7656.0	282.9
19	26C	27	CGAGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCCTC	8259.4	300.2
20	26G	27	GGAGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCCTC	8299.4	304.6
21	28A	29	ATGAGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCCTCA	8900.8	332.7
22	28T	29	TTGAGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCCTCA	8891.8	326.7
23	30C	31	CCTGAGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCCTCAG	9495.2	344.0
24	30G	31	GCTGAGGCA <u>TTAACATATGTTAA</u> TGCCTCAG	9535.2	348.4
25	11	11	GTTAATGCCTC	3308.2	113.6
26	12	12	GTTAATGCCTCG	3637.4	125.4
27	13	13	GTTAATGCCTCGC	3926.6	132.8
28	14	14	GTTAATGCCTCGCG	4255.8	144.6
29	15b	15	GTTAATGCCTCGCGC	4545.0	152
30	16b	16	GTTAATGCCTCGCGCG	4874.2	163.8
31	17b	17	GTTAATGCCTCGCGCGC	5163.4	171.2
32	18b	18	GTTAATGCCTCGCGCGCG	5492.6	183.0
33	15	15	GAGGCATTAACATAT	4601.0	179.2
34	16	16	CGAGGCATTAACATAT	4890.2	186.6
35	17	17	GCGAGGCATTAACATAT	5219.4	198.4
36	18	18	CGCGAGGCATTAACATAT	5508.6	205.8
37	19	19	GCGCGAGGCATTAACATAT	5837.8	217.6
38	20	20	CGCGCGAGGCATTAACATAT	6127.0	225.0
39	21	21	GCGCGCGAGGCATTAACATAT	6456.2	236.8
40	22	22	CGCGCGCGAGGCATTAACATAT	6745.4	244.2

Tabelle 16: Oligonukleotide für Protein-DNA-Wechselwirkungsstudien mittels BIAcore. Die PrfA-Box ist in rot hervorgehoben.

Nr.	Oligo-Name	Länge (bp)	Sequenz (5' → 3')
1	PrfA-box 28A-Biotin	27	Biotin-ATCGTCG <u>TTAACAAATGTTAA</u> TGCCTC
2	PrfA-Box-Oligo 7-28T	27	TGAGGCATT <u>AACATTTGTT</u> AACGACGA

5.1.5 Antikörper

Als Antikörper gegen His₆-PrfA wurde der *Penta-His*-Antikörper der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dieser Antikörper ist ein monoklonaler Primärantikörper aus der Maus, der einen 5 x Histidin-Anker erkennt. Als polyklonaler Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Dianova) verwendet. Dieser Sekundärantikörper ist mit einer Peroxidase gekoppelt, so dass ein Nachweis über „*Enhanced Chemoluminescence*“ (*Lumi Light Western Blotting Substrate-Kit* (Roche)) möglich ist.

5.2 Puffer und Medien

5.2.1 Proteinbiochemische Pufferlösungen

Die in Tabelle 17 aufgelisteten Puffersysteme wurden für proteinbiochemische Fragestellungen verwendet.

Tabelle 17: Zusammensetzungen der Puffer für proteinbiochemische Methoden.

Puffer	Zusammensetzung
BIAcore-Puffer I	10 mM Hepes pH 7.0; 150 mM NaCl; 3 mM EDTA; 0.005 % (w/v) Tween 20
BIAcore-Puffer II	10 mM Hepes pH 8.5; 200 mM NaCl; 3 mM EDTA
Blotpuffer	10 % (w/v) CAPS; 10 % (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung	30 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0.25 % (w/v) Coomassie-Blau R-250
Dialyse-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.7; 250 mM NaCl
Elektrophorese-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8.7; 0.1 % (w/v) SDS; 0.4 M Glycin
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 10 mM reduziertes Glutathion
Entfärberlösung	40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure
GPC-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.7; 250 mM NaCl
GST-Aufschlusspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7.0; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 1 Tablette/L Complete-Proteaseinhibitor, 4200 U/L Benzonase

Material und Methoden

GST-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7.0; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT
Ni-NTA Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.7; 300 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol; 250 mM Imidazol
Ni-NTA Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0; 300 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol; 1 Tablette/L Complete-Proteaseinhibitor ohne EDTA
10 x PBS	1.37 M NaCl; 27 mM KCl; 80 mM NaH ₂ PO ₄ ; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7.4
Protein-Hochsalzpuffer	25 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.7; 1 M NaCl
Protein-Niedrigsalzpuffer	25 mM NaH ₂ PO ₄ pH 6.7
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0.1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer	10 mM Tris-HCl pH 6.8; 20 % (v/v) Glycerin; 500 mM β-Mercaptoethanol; 10 % (w/v) SDS; 0.2 mg/mL Bromphenolblau
Trocknerlösung	50 % (v/v) Methanol; 3 % (v/v) Glycerin
Zellaufschlusspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8.0; 250 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol; 4200 U/L Benzonase; 1 Tablette/L Complete-Proteaseinhibitor ohne EDTA

5.2.2 Molekularbiologische Pufferlösungen

Für die molekularbiologischen Methoden wurden die Puffer aus Tabelle 18 eingesetzt.

Tabelle 18: Komponenten der molekularbiologischen Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
5 x EMSA-Bindungspuffer	50 mM HEPES pH 8.0; 25 mM MgCl ₂ ; 250 mM KCl; 10 % (w/v) Ficoll; 0.025 % (w/v) Bromphenolblau; 0.025 % (w/v) Xylencyanol
1 x Oligo-Annealingpuffer	100 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 mM EDTA
Oligo-Hochsalzpuffer	10 mM NaOH; 1 M NaCl
Oligo-Niedrigsalzpuffer	10 mM NaOH
50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Base; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA
10 x TBE-Puffer	0.83 M Tris-Base; 0.9 M Borsäure; 0.03 M EDTA

5.2.3 Medien für Bakterien

Alle Medien für die Bakterienkultur (Tabelle 19) wurden durch Autoklavieren (20 min, 121°C) sterilisiert (Autoklav HAST 4-5-6, Zirbus, Bad Grund). Hitzeempfindliche Zusätze wie Antibiotika wurden sterilfiltriert und erst bei einer Temperatur unter 50°C zum autoklavierten Medium hinzugefügt. Je nach Plasmid und Bakterium wurden folgende Antibiotika verwendet: 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin und 34 µg/mL Chloramphenicol.

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 15-20 g/L Bacto-Agar dem Medium zugegeben.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Medien für Bakterienkulturen.

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g/L NaCl; 5 g/L Hefe-Extrakt; 10 g/L Trypton
NYZ ⁺ -Medium	10 g/L NZ amine (<i>casein hydrolysate</i>); 5 g/L Hefe-Extrakt; 5 g/L NaCl; 12.5 mL 1 M MgCl ₂ ; 12.5 mL 1 M MgSO ₄ ; 10 mL 2 M Glucose
SOB-Medium	20 g/L Trypton; 5 g/L Hefe-Extrakt; 0.5 g/L NaCl; 0.19 g/L KCl
SOC-Medium	98 mL SOB-Medium; 1 mL 2 M Glucose; 1 mL 1 M MgCl ₂ ; 1 mL 1 M MgSO ₄
2xYT-Medium	5 g/L NaCl; 10 g/L Hefe-Extrakt; 16 g/L Trypton

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Klonierung von PrfA wurde die PCR mit dem Vektor pGEX-6P1-PrfA als Matrize (*template*) angewendet. Die PCR wurde in 50 µL Ansätzen durchgeführt und enthielt 1-100 ng *template*-DNA, je 10 mM dNTPs (TaKaRa, Otsu, Japan), je 10 pmol 5'- und 3'-Primer (Oligonukleotide 1 und 2, Tabelle 14), 1 Unit Pfu-Polymerase (Roche, Mannheim) und 5 µL Polymerase-Reaktionspuffer (Roche, Mannheim). Die PCR-Zyklen wurden in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen) wie folgt durchgeführt: zu Beginn 2 min Denaturierung bei 95°C, dann 39 Zyklen mit 95°C für 45 s Denaturierung, 50°C für 60 s Anlagerung der Primer, 72°C für 2 min Synthese, abschließend für 7 min 72°C finale Synthese.

5.3.2 Ortsspezifische Mutagenese (*site-directed mutagenesis*)

Für den gezielten Basenaustausch Gly145→Ser bei PrfA wurde die ortsspezifische Mutagenese mit dem Kit von Stratagene (QuikChange[®] Multi Site-directed Mutagenesis Kit) durchgeführt. Als *template* wurde pQE30-PrfA und die Oligonukleotide 3 und 4 (Tabelle 14) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (Stratagene, La Jolla, USA).

5.3.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* TG2 Zellen wurden 2 mL Übernachtskulturen in LB-Medium bei 37°C und 220 U/min im Schüttelinkubator kultiviert und anschließend bei 5'000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin

Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die hochreine Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

5.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte über Lichtabsorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption (A) von 1.0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht 50 $\mu\text{g/mL}$ doppelsträngiger DNA. Der Verunreinigungsgrad der DNA-Lösung durch Proteine wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption der aromatischen Aminosäurereste) ermittelt. Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

5.3.5 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit Restriktionsendonukleasen wird für die Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt. In dieser Arbeit wurden die Restriktionsreaktionen mit den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen durchgeführt. Die jeweilige DNA-Lösung (0.1-0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) wurde mit 1 bis 5 Units Enzym pro μg DNA versetzt. Die Reaktion erfolgte für 3 h bei 37°C . Es wurden die Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) verwendet.

5.3.6 Ligation

Für die Ligation wurde Plasmid-DNA und DNA-Fragmente in einem Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Die Ligation wurde in 10 μL -Ansätzen unter Zugabe der T4-Ligase (1 Unit, Roche, Mannheim) und T4-Ligase-Reaktionspuffer (Roche, Mannheim) für 4 h bei 16°C durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Behandlung für die Transformation (s. Kap. 5.3.10) in *E. coli* eingesetzt.

5.3.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde nach einer modifizierten Kettenabbruch-Methode durch Didesoxyribonukleotide (Sanger *et al.*, 1977) von der Firma GATC (Konstanz, <http://www.gatc.de>) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden am Computer mit dem Programm SeqManII (DNASTAR, Madison, WI, USA) ausgewertet.

5.3.8 Agarosegelelektrophorese

Die Durchführung der Agarosegelelektrophorese erfolgte analog Sambrook (1989) in 1 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer. Pro 100 mL Agarosegel-Lösung wurden 5 μL einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Die

Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelträgern (Biorad, München) bei konstanter Spannung von 80 V (Gelgröße: 10 cm x 6 cm) mit einem PowerPac 300-Netzgerät (Biorad, München) für 30 - 60 min. Die DNA-Lösungen wurden im Verhältnis 1:10 mit einem 10 x Gelladepuffer (BlueJuice, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Die DNA wurde durch UV-Durchlicht eines Transilluminators bei 312 nm sichtbar gemacht und photographiert (Geldokumentationsanlage, Kodak). Die Größen- und Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Vergleich mit einem kommerziellen Standard (1Kb Plus DNA ladder, Invitrogen, Karlsruhe).

5.3.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde das DNA-Fragment der gewünschten Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und auf einer Silikagel-enthaltenen Säule immobilisiert. Nach verschiedenen Waschschritten wurde die DNA mit 50 µL H₂O eluiert.

5.3.10 Transformation von Plasmid-DNA in CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen

Für eine Transformation wurden 50 µL der CaCl₂-kompetenten Zellen mit 50-100 ng Plasmid-DNA bzw. mit einem Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30 s Hitzeschock bei 42°C und weiteren 5 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 mL sterilem LB-Medium. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C und 1'000 U/min geschüttelt (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg) und anschließend kurz bei 2'700 U/min und 4°C zentrifugiert. Etwa 700 µL des Mediums wurden entfernt. Die Zellen wurden in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert, auf LB-Agar mit einem geeigneten Selektionsmarker ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.3.11 Reinigung von Oligonukleotiden für die Kristallisation

Zur Trennung verkürzter Synthesenebenprodukte von den gewünschten Oligonukleotiden wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Zunächst wurde 1 mg eines Oligonukleotids in 1 mL einer 10 mM NaOH-Lösung aufgenommen, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Anschließend wurde die Probe auf die mit Oligo-Niedrigsalzpuffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule (MonoQ HR 5/5, Pharmacia) gegeben und dort gebunden. Durch Beimischung von Oligo-Hochsalzpuffer zum -Niedrigsalzpuffer wurde nun die Salzkonzentration auf der Säule sukzessiv von 0 M NaCl auf 1 M NaCl erhöht, um das Oligonukleotid von der Säule zu eluieren. Fraktionen mit hoher Absorption bei 260 nm wurden während der

Elution mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen (Äkta Purifier, Amersham Biosciences, Freiburg).

5.3.12 Entsalzung und Ankonzentrierung von Oligonukleotiden

Um möglichst kein Salz in die Kristallisationsansätze einzubringen, wurden die Oligonukleotide nach der Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie entsalzt. Dazu wurden bei kurzen Oligonukleotiden (14 - 15 bp) NAP-10-Säulen (Pharmacia), die auf das Prinzip einer Größenausschlusschromatographie basieren, entsprechend den Herstellerangaben angewandt. Längere Oligonukleotide (16 - 30 bp) wurden mittels Dialyse (Spektra/Por, 3.5 kDa Ausschlussgröße) gegen deionisiertes Wasser für 20 h bei 4°C entsalzt. Nach dem Entsalzen wurde die Konzentration der Proben bestimmt, die Oligonukleotide in einer Speedvac-Anlage (Thermo Savant, Savant) eingetrocknet, durch Zugabe von deionisiertem Wasser auf eine Konzentration von 5 mg/mL eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

5.3.13 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Für die Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden, die für Kristallisationsexperimente eingesetzt werden sollten, wurde der Extinktionskoeffizient und das Molekulargewicht des jeweiligen Oligonukleotides verwendet (Tabelle 15). Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach Gleichung 1:

$$c = \frac{A_{260\text{nm}} \cdot Mr \cdot \text{Verdünnung}}{1 \text{ ml} \cdot \epsilon_{260}} \quad \text{Gl. 1}$$

c = Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]

Mr = Molekulargewicht des Oligonukleotids [g/mol]

ϵ_{260} = molarer Extinktionskoeffizient des Oligonukleotids bei 260 nm [$A_{260\text{nm}}/\mu\text{mol}$]

5.3.14 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Bildung der doppelsträngigen Oligonukleotide für die Kristallisationsexperimente wurden die komplementären Einzelstränge hybridisiert. Dazu wurden Lösungen mit äquimolaren Mengen der gereinigten und entsalzten Oligonukleotide in 10 x Oligo-Annealingpuffer hergestellt und 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein langsamer Abkühlprozess über Nacht bei RT.

5.3.15 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Zur Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen wurden der EMSA, auch *gel-shift assay* genannt, verwendet. Das System basiert auf der Beobachtung, dass die Bindung von Protein an DNA-Fragmente zu einer verminderten elektrophoretischen Mobilität dieser DNA-Fragmente in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel führt.

In dieser Arbeit wurden 8 %ige EMSA-Gele verwendet, die sich folgendermaßen zusammensetzten: 13.3 mL (v/v) Polyacrylamid (30 %); 2.5 mL 10 x TBE; 34.2 mL H₂O; 0.5 mL 10 % APS; 0.1 mL TEMED.

Die hohe Sensitivität des EMSA liegt in der Verwendung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden. Hierzu wurde 1 pmol Oligonukleotid mit 1 x Kinase-Puffer (NEB, Frankfurt am Main), 3000 Ci/mmol γ -[³²P]-ATP und 10 Units T4-Polynukleotid-Kinase (NEB) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Kinasereaktion durch eine 10-minütige Erwärmung auf 65°C gestoppt. Anschließend wurden nicht radioaktiv-markierte Oligonukleotide und Salze über MicroSpin G-50 Säulen (Amersham Biosciences) von den radioaktiv-markierten Oligonukleotiden abgetrennt. Die Effizienz der Markierung wurde mittels Scintillationszähler ermittelt.

Die PrfA-DNA-Bindungsreaktion setzte sich aus 500 ng PrfA, 5 µL 5 x EMSA-Bindungspuffer und etwa 50 fmol radioaktiv-markiertes Oligonukleotid (Tabelle 16, Nr. 22) zusammen. Der Gesamtreaktionsansatz mit einem Endvolumen von 25 µL wurde für 30 min bei 37°C inkubiert.

Das EMSA-Gel wurde vor dem Auftragen der Proben für etwa 30 - 45 min bei 60 - 70 V einem Vorlauf unterzogen. Der eigentliche Gellauf betrug in einem 8 %igem Gel etwa 4 h bei konstanten 120 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf zwei Lagen 3MM Whatmann-Filterpapier transferiert, mit Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und 30 min bei 60°C auf einem Gelrockner getrocknet. Das getrocknete Gel wurde schließlich in eine Expositionskassette überführt und je nach Stärke der Sonden für mehrere Stunden oder Tage exponiert. Das Autoradiogramm wurde mit Hilfe eines Phospho-Imagers (Kodak) eingescannt.

5.4 Mikrobiologische Methoden

5.4.1 Kultivierung von *E. coli*

Alle *E. coli*-Stämme wurden aerob, bei 37°C und 180 U/min (Inkubationsschüttler Infors Af 110, Infors, Einsbach) in Flüssigkulturen in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben angezogen, deren Volumina dem Fünffachen des Kulturvolumens entsprachen. Alle plasmidhaltigen Stämme wurden dabei stets durch Zugabe eines geeigneten Antibiotikums unter Selektionsdruck gehalten. Für die Kultivierung von Bakterien für die Proteinexpression wurde eine Vorkultur (100 mL) entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder mit einer Spatelspitze eines

Glycerinstocks inokuliert. Das Wachstum der Kulturen wurde durch regelmäßige Messung der Absorption bei 600 nm verfolgt.

Zur Kultivierung von *E. coli* auf festen Medien wurden 50 - 150 µL einer *E. coli*-Zellsuspension gleichmäßig auf LB-Agarplatten mit entsprechender Antibiotikazugabe verteilt und bei 37°C über Nacht kultiviert.

5.4.2 Stammhaltung von *E. coli*

Eine kurzfristige Lagerung von *E. coli*-Kulturen erfolgte auf Agarplatten (etwa vier Wochen). Für die längerfristige Lagerung wurden Glycerin-Stocklösungen eingesetzt. Dabei wurden 3 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. 500 µL der Zellsuspension wurden mit 500 µL einer Glycerol-Stocklösung (40 % (v/v) Glycerol in LB-Medium) versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.5 Biochemische Methoden

5.5.1 Proteinproduktion und Herstellung von *E. coli*-Zellextrakten

Die Produktion von PrfA erfolgte mit Hilfe des pQE30-PrfA-Plasmides in M15-Zellen mit 2xYT-Medium zuzüglich Kanamycin und Ampicillin. Die Produktion von RhoA erfolgte mit dem pGEX-2TGL-RhoA-Plasmid in BL21-Codon Plus-Zellen mit 2xYT-Medium zuzüglich Chloramphenicol und Ampicillin.

Die Produktion der Fusionsproteine erfolgte im Detail folgendermaßen: zunächst wurde eine Einzelkolonie von *E. coli*-Zellen in 100 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C und 180 U/min inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde anschließend mit 2 L 2xYT-Medium (zuzüglich Antibiotika) verdünnt ($A_{600\text{nm}} = 0.1$) und bis zu einer Absorption von 0.6 bei einer Wellenlänge von 600 nm kultiviert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 0.1 mM zugegeben und die Bakterien über Nacht unter Schütteln bei 21°C kultiviert. Zur Proteingewinnung wurden die Bakterien für 10 min bei 4°C und 5'000 U/min (Zentrifuge Beckman JA10 Rotor) geerntet. Das aus einer 2 L Flüssigkultur gewonnene Bakteriensediment wurde in 30 mL Puffer (GST-Aufschlusspuffer für GST-Fusionsproteine und Zellaufschlusspuffer für His₆-Fusionsproteine) resuspendiert. Die im Puffer enthaltene Benzonase (4200 U/L, Merck, Darmstadt), eine Endonuklease, die DNA und RNA degradiert, verringert die Viskosität des Zellaufschlusses. Um Proteasen zu inhibieren, wurde eine Mischung verschiedener Proteaseinhibitoren (1 Tablette/L Complete Protease Inhibitor, Roche Diagnostics, Mannheim) zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe der French Press (SLM-Aminco) unter Druck aufgeschlossen (1000-1500 psi). Diese aufgeschlossene Suspension wurde anschließend bei 16'000 U/min 1 h bei 4°C (Zentrifuge Beckman JA18 Rotor) zentrifugiert. Der

klare Überstand enthält nach der Zentrifugation die löslichen Zellproteine, während sich im Pellet das unlösliche Protein befindet. Zur Analyse der unlöslichen Proteine wurden die sedimentierten Zelltrümmer in 8 M Harnstoff aufgenommen und ebenfalls zentrifugiert (10 min bei 5'000 U/min und 4°C). Der Überstand enthielt nach diesem Zentrifugationsschritt die wasserunlöslichen Proteine. Die Fraktion der löslichen Proteine wurde für die Isolierung und Reinigung der Fusionsproteine weiterverwendet. Die Fraktion der unlöslichen Proteine wurde nach einer Analyse im SDS-Gel verworfen.

5.5.2 Chromatographische Trennmethoden

5.5.2.1 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose

Durch die N-terminale Fusion von PrfA mit sechs Histidinen kann eine metallaffinitätschromatographische Reinigung des Zielproteins mit Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA)-Agarose erfolgen (Qiagen).

Zunächst wurde die Ni-NTA-Agarose (Bettvolumen etwa 5 mL) mit 10 mL Ni-NTA-Waschpuffer äquilibriert. Der klare Überstand aus Kapitel 5.5.1, der die löslichen Proteine enthielt, wurde anschließend mit der äquilibrierten Agarose bei 4°C für eine Stunde unter leichtem Rotieren inkubiert. Nach luftblasenfreiem Applizieren der inkubierten Agarose in eine Glassäule mit Fritte wurde der Durchlauf mit Hilfe eines Durchflussphotometers (Econo UV Monitor, Bio-Rad, München) und einer peristaltischen Pumpe (Peristaltic Pump P1, Pharmacia) gesammelt und die Absorption bei 280 nm gemessen. Die Säule wurde mit Ni-NTA-Waschpuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm auf das Niveau des Puffers gesunken war. Die Elution von His₆-PrfA von der Ni-NTA-Agarose erfolgte durch Zugabe von ca. 200 mL 250 mM Imidazol enthaltenem Ni-NTA-Elutionspuffer. Zur Entfernung von Imidazol wurde die Proteinlösung gegen Dialyse-Puffer dialysiert.

5.5.2.2 Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Sepharose (GS)

Durch die Fusion von RhoA mit Glutathion-S-Transferase (GST) kann eine metallaffinitätschromatographische Reinigung des Zielproteins mit Glutathion-Sepharose erfolgen (Amersham Biosciences, Freiburg), da GST spezifisch und mit hoher Affinität an Glutathion bindet.

Zunächst wurde die GS (Bettvolumen etwa 10 mL) mit 20 mL GST-Puffer äquilibriert. Der klare Überstand aus Kapitel 5.5.1, der die löslichen Proteine enthielt, wurde anschließend mit der äquilibrierten GS bei 4°C für eine Stunde unter leichtem Rotieren inkubiert. Nach Bindung des Zielproteins wurde die GS in eine Glassäule mit Fritte überführt. Die GS wurde mit dem zehnfachen Volumen GST-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution von GST-RhoA erfolgte mit dem GST-Elutionspuffer, das reduziertes Glutathion als Kompetitor enthielt.

Die Abspaltung des GST-Fusionsanteils von RhoA erfolgte sowohl direkt auf der GS als auch in Lösung. Dazu wurden 50 Units Thrombin mit 1 mL GS-Bettvolumen bzw. 80 Units Thrombin mit 80 ml GST-RhoA-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Abspaltung des GST-Fusionsanteils in Lösung erfolgte bei gleichzeitiger Dialyse gegen RhoA-Puffer (50 M Tris-HCl, pH 7.0; 10 mM NaCl; 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT). Die Elution des geschnittenen Proteins von der GS erfolgte durch Zugabe von GST-Puffer. Vor Elution wurde die vollständige Abspaltung des GST-Fusionsanteils von RhoA mittels SDS-PAGE überprüft.

5.5.2.3 Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Anzahl und Verteilung geladener Aminosäuren bei einem bestimmten pH-Wert sind für jedes Protein ein Charakteristikum. Die IEC nutzt die daraus folgenden Unterschiede in den Ladungszuständen von Proteinen bei gegebenem pH-Wert zu deren Trennung aus.

In dieser Arbeit wurde die kommerziell erhältliche Säule MonoS HR 10/10 (Pharmacia) verwendet, die negativ geladene Gruppen auf einer Trägermatrix enthält. Um eine Interaktion der Proteine mit den geladenen Gruppen zu ermöglichen, ist es notwendig, vor der IEC die Salzkonzentration auf ein Minimum zu reduzieren und den optimalen pH-Wert einzustellen. Dazu wurde die Proteinlösung gegen Niedrigsalzpuffer dialysiert, filtriert (0.45 µm) und über einen Superloop auf die mit Niedrigsalzpuffer äquilibrierte IEC-Säule geladen. Die Flussrate erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen linear ansteigenden Salzgradienten (Hochsalzpuffer). Das Eluat wurde unter Beobachtung der A_{280nm} fraktioniert. Im SDS-Gel analysierte, proteinhaltige Ziel-Fraktionen wurden vereint, konzentriert und bei 4°C gelagert.

5.5.2.4 Gelpermeationschromatographie

Bei der Gelpermeationschromatographie oder Gelfiltration werden Proteine aufgrund von Größenunterschieden beim Durchgang durch eine Gelmatrix mit definierter Porengröße getrennt. In dieser Arbeit wurden für präparative Gelfiltrationen eine HiLoadTM 16/60 Säule mit SuperdexTM 75 *prep grade* und für analytische Gelfiltrationen eine SuperdexTM 75 HR 10/30 Säule (beide Pharmacia) verwendet. Der Trennbereich beider Säulen liegt zwischen 10 und 75 kDa. Die Flussrate und das Probenvolumen entsprachen jeweils den Herstellerangaben. Das Eluat wurde unter Beobachtung der A_{280nm} mittels Fraktionskollektor fraktioniert und anschließend im SDS-Gel analysiert. Die Fraktionen mit dem Zielprotein wurden vereint, konzentriert und bei 4°C gelagert.

5.5.3 Dialyse

Zum Austausch von Puffersubstanzen oder Entfernen von Salzen wurden Proteinlösungen dialysiert. Als Membranen wurden die Produkte Spektra/Por (Spectrum Laboratories) sowie Snake Skin (Pierce, Rockford, USA) mit jeweils einer Ausschlussgrenze von 3.5 kDa eingesetzt. Die Dialysen wurden bei 4°C über Nacht durchgeführt. Das Volumen der Pufferlösung betrug dabei mindestens das Zwanzigfache des Probenvolumens.

5.5.4 Konzentrierung von Proteinen

Die Konzentrierung von Proteinlösungen mit VivaSpin 15-Konzentratoren (Viva Science, Sartorius, Göttingen) beruht auf dem Prinzip der Ultrafiltration. Die verwendeten Konzentratoren besitzen eine Polyethersulfon-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa. Bei kleineren Volumina (< 2 mL) wurden VivaSpin 500-Konzentratoren (500 µL Fassungsvermögen) verwendet. Die Konzentratoren wurden entsprechend der Herstelleranweisung benutzt.

5.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Trennung von Proteingemischen und zur Reinheitskontrolle von Proteinpräparationen wurde die denaturierende Elektrophorese mit Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) im diskontinuierlichen System nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewandt.

Als SDS-Gele wurden 15 %ige Trenngele und 5 %ige Sammelgele in Minigel-Apparaturen (Bio-Rad, München) hergestellt. Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit 5 fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C hitzedenaturiert und 5-10 µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA in Elektrophoresepuffer durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend entweder auf eine Membran transferiert (s. Kap. 5.5.6) oder mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Zur Anfärbung von Proteinbanden wurde das Gel mit der Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle kurz erhitzt und anschließend der überschüssige Farbstoff mit der Entfärbelösung entfernt. Zur Aufbewahrung wurden die Gele 1-2 h in Trocknerlösung inkubiert und anschließend in einen Rahmen zwischen Zellophanfolien (Gel Air Cellophane Support, Bio-Rad) gespannt und getrocknet. Die getrockneten Gele wurden zur Dokumentation eingescannt.

5.5.6 Proteintransfer auf Membranen (Western Blot)

Um Proteine spezifisch mit Antikörpern nachzuweisen, wurden diese mittels eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Die Membranen immobilisieren die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Hierzu wurden die Proteine

zunächst mittels SDS-PAGE (s. Kap. 5.5.5) getrennt und das Gel 15 min in Blotpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde parallel für 1 min in Methanol aktiviert und dann ebenfalls in den Blotpuffer überführt. Whatman-Filterpapier wurde ebenfalls 15 min in Blotpuffer getränkt und auf die Anodenplatte der Transferkammer platziert. Darüber wurden die Membran und anschließend das Gel luftblasenfrei geschichtet. Zwischen Gel und Kathodenplatte der Transferkammer wurde erneut Whatman-Papier gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 1 h. Nach Transferende wurde die Membran für anschließende Untersuchungen (immunologischer Nachweis von Proteinen (s. Kap. 5.5.7) und N-terminale Sequenzanalyse (s. Kap. 5.5.9)) weiter behandelt.

5.5.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Der spezifische Nachweis, der auf der Membran immobilisierten Ziel-Proteine erfolgte durch entsprechende Antikörper. Um unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit der Membran zu vermeiden, wurde die Membran zuvor 1 h mit Blockierlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS) bei Raumtemperatur abgesättigt und dann über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert (1:10'000-Verdünnung in PBS). Zur Entfernung der ungebundenen primären Antikörper wurde die Membran nachfolgend 3 x für 10 min in PBS gewaschen und anschließend für 1-2 h bei RT mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (1:5'000 Verdünnung in PBS) inkubiert. Nach Entfernung ungebundener sekundärer Antikörper durch erneutes Waschen mit PBS (3 x 10 min) erfolgte die Nachweisreaktion mit dem *Lumi Light Western Blotting Substrate-Kit* (Roche) nach Herstellerangaben.

5.5.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration einer Proteinprobe wurde durch Messung ihrer Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Die aromatischen Aminosäuren, insbesondere Tryptophan und Tyrosin absorbieren Licht dieser Wellenlänge. Daher kann aus den Extinktionskoeffizienten dieser Aminosäuren der Koeffizient des Gesamtproteins annähernd berechnet werden. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich die Konzentration des Proteins berechnen:

$$c = \frac{A_{280\text{nm}} \cdot M_r}{\epsilon_{280} \cdot d} \quad \text{Gl. 2}$$

ϵ_{280} = molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
 c = Konzentration [g/L]
 d = Schichtdicke (1 cm)
 $A_{280\text{nm}}$ = Absorption bei 280 nm
 M_r = Molekulargewicht [g/mol]

Das theoretische Molekulargewicht von His₆-PrfA ist 28568 g/mol und der spezifische Extinktionskoeffizient ϵ_{280} beträgt 40350 M⁻¹cm⁻¹. Das theoretische Molekulargewicht von RhoA ist 22600 g/mol und der spezifische Extinktionskoeffizient ϵ_{280} beträgt 18140 M⁻¹cm⁻¹. His₆-C3stau2 besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 25036 g/mol mit einem spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} von 21050 M⁻¹cm⁻¹.

5.5.9 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung von Proteinen erfolgte durch wiederholten Edman-Abbau und anschließender Identifizierung der jeweils abgespaltenen Aminosäure. Zur Probenvorbereitung wurden die zu sequenzierenden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (s. Kap. 5.5.5) und auf eine PVDF-Membran überführt (s. Kap. 5.5.6). Nach Anfärben der Proteinbanden mit Ponceaurot (1 % (w/v) Ponceaurot in Essigsäure) wurde die Bande mit dem Zielprotein ausgeschnitten, mit H₂O entfärbt und für die Sequenzierung eingesetzt. Bei bereits gereinigten Proteinen konnte die Sequenzierung alternativ auch direkt mit der Proteinlösung durchgeführt werden. Die Sequenzanalysen wurden von Frau R. Getzlaff (GBF) in einem automatisierten Prozess mittels Gasphasensequenzator (494 Protein Sequenzer, Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

5.5.10 Massenspektrometrische Untersuchung der Proteinproben

Das Molekulargewicht von Proteinen wurde basierend auf der MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry*) mit dem Ultraflex TOF/TOF von Bruker bestimmt. Diese Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe Biophysikalische Analytik unter der Leitung von Dr. Manfred Nimtz (GBF) durchgeführt. Für die Messungen wurden jeweils 15 µL Proteinprobe (100 pmol/µL) in Niedrigsalz-Puffer eingesetzt.

5.5.11 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die dynamische Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering*, DLS) ist ein Verfahren, mit dem aus der Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen in Lösung Aussagen über die Raumausfüllung, dem sog. hydrodynamischen Radius, des streuenden Partikels gemacht werden können. Neben dem hydrodynamischen Radius erhält man aus der DLS außerdem Informationen über die Homogenität der Proteinlösung. Alle DLS-Messungen wurden an einem DynaPro MS/X Gerät der Firma DynaPro (Berk, England) durchgeführt. Vor der Messung wurde die gereinigte Proteinlösung 10 min bei 14'000 U/min zentrifugiert und der zu analysierende Überstand vorsichtig abgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Softwarepaket Dynamics.

5.5.12 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR)

Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen in Echtzeit, ohne dass dabei eine Markierung der Moleküle erfolgen muss (Fagerstam *et al.*, 1992; Silin & Plant, 1997). Eine der beiden interagierenden Komponenten wird auf der Sensoroberfläche eines Chips immobilisiert (Ligand) und die andere in einem kontinuierlichen Fluss über die Sensoroberfläche geleitet (Analyt). Das Prinzip beruht dabei auf Veränderungen in der Massenkonzentration von Makromolekülen auf der Oberfläche eines Sensorchips. Die eigentliche Messgröße ist dabei der Brechungsindex der Flüssigkeit direkt über dem Chip. Dieser ändert sich proportional zur Dichte der Flüssigkeit. Der zeitliche Verlauf der Dichteänderung kann durch das BIAcore-Gerät (BIAcore2000TM, Pharmacia) verfolgt werden, wobei die Änderung des Brechungsindex in ein Resonanzsignal umgewandelt wird.

Messung der C3stau2-RhoA-Interaktion

Für die C3stau2-RhoA-Studie wurde ein CM5-Chip (BIAcore) eingesetzt. Auf dem CM5-Chip befindet sich eine Dextranmatrix, auf die mit Hilfe der Aminkopplung C3stau2 chemisch immobilisiert wurde. Die Aminkopplung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Wechselwirkung von C3stau2 mit RhoA erfolgte im BIAcore-Puffer I bei verschiedenen Flussraten.

Messung der PrfA-DNA-Interaktion

Für die PrfA-DNA-Interaktionsstudien wurde ein SA-Chip (BIAcore) verwendet, der eine Streptavidin-Oberfläche besitzt, an die biotinylierte Oligonukleotide gekoppelt wurden (Tabelle 16). Eine Messreihe erfolgte durch die Injektion verschiedener Konzentrationen von PrfA (5 μ M bis 0.01 μ M) auf die Oberfläche des Chips.

Die zu untersuchenden Protein-Proben wurden in BIAcore-Puffer II verdünnt und kurz vor Verwendung für 10 min bei 12'000 U/min zentrifugiert. Die Injektion der Proben erfolgte bei einer Flussrate von 10 μ L/min. Nach einer Assoziation von 180 s erfolgte eine zweiminütige Dissoziation, wobei die Probenlösung durch BIAcore-Puffer II verdrängt wurde. Anschließend wurden gebundene Proteine durch eine Injektion von 10 μ L 1 M NaCl entfernt, wodurch die anfängliche Basislinie wieder erreicht wurde.

Auswertung der gemessenen PrfA-DNA-Interaktionen

Die Auswertung der Messungen erfolgte durch das BIA-Evaluierungsprogramm in Form eines Sensorgramms, in welchem die Veränderung des Resonanzsignals in Resonanzeinheiten (RU) gegen die Zeit aufgetragen ist. Für die Auswertung des Messsignals wurde zunächst mit dem BIA-

Evaluierungsprogramm 3.2 das Signal einer Referenzzelle (ohne immobilisiertem Oligonukleotid) von dem Sensorgramm abgezogen und alle Sensorgramme (die mit verschiedenen Proteinkonzentrationen aufgenommen wurden) auf eine Basislinie gebracht. Anschließend wurde das Messsignal im Gleichgewicht der Reaktionen (RU_{eq}) abgelesen und gegen die Konzentration des PrfA-Proteins mit dem Programm SigmaPlot dargestellt. Aufgrund einer unspezifischen Bindung des Proteins an der Chip-Oberfläche musste bei der Auswertung eine leicht abgewandelte Langmuir-Bindungsisotherme angewandt werden. Dazu wurde das 1:1 Langmuir-Model um den Term „ $[PrfA] \cdot N$ “ erweitert. Die Auswertung der Sensorgramme erfolgte über folgende Bindungsamplitude:

$$RU_{eq} = \frac{RU_{max} \cdot [PrfA]}{K_D + [PrfA]} + [PrfA] \cdot N \quad \text{Gl. 3}$$

RU_{eq} = Differenzsignal zwischen Mess- und Referenzzelle im Gleichgewicht der Interaktion

RU_{max} = maximal zu erreichendes Differenzsignal (Maß der zur Verfügung stehenden Bindungsplätze)

K_D = Bindungskonstante der Dissoziation

$[PrfA]$ = molare PrfA-Konzentration (Wildtyp oder Mutante)

N = Parameter für die unspezifische Bindung

Aus den gemessenen Werten RU_{eq} bei verschiedenen Konzentrationen wurde über nicht-lineare Kurvenanpassung (Witte *et al.*, 2003) mit dem Programm SigmaPlot (Programmversion 8.0, Chicago) die Dissoziationskonstante K_D bestimmt.

5.6 Röntgenkristallographische Methoden

Die Röntgenstrukturanalyse ist derzeit die wichtigste Methode zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen. Mit Hilfe der Kristallstruktur ist es z. B. möglich, den genauen Katalysemechanismus von Enzymen zu verstehen und Vorhersagen über mögliche Inhibitoren zu treffen. Bei medizinisch relevanten Enzymen können solche Inhibitoren zu Medikamenten weiterentwickelt werden (*drug design*). Darüber hinaus können spezifische Protein-Protein- oder Protein-DNA-Interaktionen durch die Aufklärung der Kristallstruktur auf atomarer Ebene ermittelt werden. Grundvoraussetzung für die Strukturaufklärung eines Proteins mittels Röntgenkristallographie ist die Produktion hochgeordneter Einkristalle von ausreichender Größe aus homogenen Proteinlösungen. Da die Kristallisationseigenschaften eines Proteins nicht vorhersagbar sind, müssen die Bedingungen empirisch ermittelt und anschließend optimiert werden. Für die Kristallqualität ist neben der Größe und dem Streuvermögen eine geringe Mosaizität (Unordnung durch unregelmäßige submakroskopische Anordnungen im Kristall) ausschlaggebend.

5.6.1 Kristallisation von Proteinen

Bei der Kristallisation wird die Löslichkeit des jeweiligen Proteins kontrolliert herabgesetzt, so dass die Proteine in Form von Kristallen ausfallen. Um die Proteine unter kontrollierten Bedingungen von einem gelösten in den kristallinen Zustand zu führen, wurde das Prinzip der Dampfdiffusion eingesetzt. Dabei wird eine konzentrierte Proteinlösung mit einer Reservoirlösung, die ein Fällungsmittel sowie Salze oder andere Additive enthält, zu einem Tropfen vermischt. Dieser Proteintropfen wird räumlich von der Reservoirlösung getrennt (Davies & Segal, 1971; Weber, 1997).

Für Kristallisationsexperimente nach der Methode des sitzenden Tropfens wurden *Crystal Clear Strips* (Reservoir: 100 µL; Hampton Research) verwendet. Auf der Erhöhung in der Reservoirkammer wurden je 2 µL der konzentrierten, zentrifugierten Proteinlösung (3 - 10 mg/mL) mit 2 µL Reservoirlösung vermischt. Die Kristallisationskammern wurden anschließend mit durchsichtigem Klebeband luftdicht verschlossen. Bei Kristallisationsexperimenten nach der Methode des hängenden Tropfens wurde die konzentrierte Proteinlösung (3 µL; 3-10 mg/mL) auf einem zuvor silikonisierten Deckgläschen mit dem gleichen Volumen der Reservoirlösung vermischt. Das Deckgläschen mit dem Tropfen wurde umgedreht und über eine mit Reservoirlösung (0.5 mL) gefüllte Vertiefung von *Limbros*-Kristallisationschalen mit angerautem Reservoirrand gesetzt. Diese Kristallisationsschalen waren ebenfalls zuvor mit Silikonöl beschichtet worden, um einen Gasaustausch mit der Umgebung zu verhindern. Die kommerziell erhältlichen multifaktoriellen Kristallisations-Screens (Jancarik & Kim, 1991) erlauben die Variation einer Vielzahl von Parametern wie pH-Wert, Puffer, Ionenstärke und Fällungsmittel. In dieser Arbeit wurden Screening-Kits der Firmen Hampton Research (*Crystal Screen I + II*, *Crystal Screen Cryo*, *Grid Screen PEG6000*, *Grid Screen PEG/LiCl* und *Grid Screen Ammonium Sulfate*, zusammen 218 Lösungen), Emerald BioSystems (*Wizard Screen I + II* und *Cryo I + II*, zusammen 192 Lösungen) und Jena Bioscience (*JBC Screen I-X*, 240 Lösungen) verwendet (Zusammensetzung siehe Herstellerangaben). Zur Verbesserung der Kristallqualität wurden die *Additive Screens I-III* (Hampton Research) nach Herstellervorschrift eingesetzt. Zum Schutz vor Oxidation der Cysteine wurden zu den Proteinlösungen 3 - 5 mM DTT zugegeben. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Kristallisationsansätze bei 20°C gelagert und in regelmäßigen Abständen unter dem Polarisationsmikroskop nach Proteinkristalle untersucht.

5.6.2 Kristallisation von Protein-DNA- bzw. Protein-Protein-Komplexen

Die Röntgenstrukturanalyse von Protein-Liganden-Komplexen liefert detaillierte Informationen über Wechselwirkungen, Bindungseigenschaften bzw. Reaktionsmechanismen.

Für Kokristallisationsexperimente von PrfA mit Oligonukleotiden (Tabelle 15) wurden die gereinigten Oligonukleotide zunächst hybridisiert (s. Kap. 5.3.14).

Anschließend wurden die Proteine mit den doppelsträngigen Oligonukleotiden in einem molaren Verhältnis 1:1.2 vermischt (3-5 mg/mL Proteinlösung). Dieses Protein-DNA-Gemisch wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 14'000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (1 µL) wurde mit dem halben Volumen der Reservoirolösung versetzt. Als Screening-Kit wurde der speziell für die Kristallisation von Protein-DNA-Komplexen hergestellte *Natrix-Screen* (Hampton Research) verwendet. Diese Kristallisationsansätze wurden bei 20°C durchgeführt.

Für die Kristallisation von C3stau2 mit RhoA wurde aufgrund von Kokristallisationsstudien von RhoA mit einer Serin/Threonin Kinase (Maesaki *et al.*, 1999) ein molares Verhältnis von 1:2 (C3stau2:RhoA) eingesetzt. Dabei wurde zunächst C3stau2 mit 5 mM TAD (β -Methylen-thiazol-4-carboxamid Adenindinukleotid) oder 5 mM NAD und RhoA mit 213 µM GDP 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der C3stau2-TAD- bzw. C3stau2-NAD-Komplex mit dem RhoA-GDP-Komplex vermischt und 45 min bei 4°C inkubiert. Vor der Kristallisation wurde der C3stau2-RhoA-Komplex bei 14'000 U/min zentrifugiert. Für diese Kokristallisationsstudien wurden Screening-Kits der Firmen Hampton Research, Emerald BioSystems und Jena Bioscience (s. auch Kap. 5.6.1) verwendet und bei 4°C gelagert.

5.6.3 Kristallographische Datenerfassung

Um die Schädigung des Kristalls durch Röntgenstrahlen zu minimieren, fand die Datensammlung bei 100 K statt. Zur Datensammlung (Oszillationsmethode, Arndt & Wonacott, 1977) mussten die Kristalle daher in einer Kryoschleife mit einem Kryoschutzmittel (z. B. Glycerin) bei 100 K schockgefroren werden. Diese Kryoschleife wurde auf einen Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse montiert. Der Winkelbereich, der pro Aufnahme durchlaufen wurde (im Allgemeinen 0.3 - 1.0°), wurde so eingestellt, dass bei den gegebenen Kristallvoraussetzungen (Zellmaße, Mosaizität) und der Kristall-Detektor-Distanz keine Überlappung der Reflexe erfolgte. Der für die Vollständigkeit eines Datensatzes abzudeckende Gesamt-Winkelbereich hängt von der Symmetrie des Kristalls und von seiner Anfangsorientierung zur Strahlrichtung ab. Er konnte mit Hilfe der *STRATEGY*-Option des *MOSFLM*-Programmpakets (Leslie, 1992) ermittelt werden. Zur Datensammlung wurden verschiedene Röntgenquellen verwendet: Heimanlage (Röntgengenerator RU-H3R, Rigaku/MSC, Cu-K α -Strahlung: $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$), Beamline BW6 und X11 (DESY, Hamburg, Synchrotron-Strahlung: $\lambda = 1.05 \text{ \AA}$ bzw. $\lambda = 0.81 \text{ \AA}$) und Beamline BL1 (BESSY II, Berlin, Synchrotron-Strahlung: $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). Als Detektoren wurden der R-AXIS IV⁺⁺ *image-plate*-Detektor von Rigaku/MSC, ein MAR-CCD-Detektor sowie ein *image-plate*-Detektor von MAR Research verwendet.

5.6.4 Datenprozessierung

Die Prozessierung der erhaltenen Oszillationsaufnahmen erfolgte mit dem Programmpaket *HKL* (Otwinowski & Minor, 1997), das mehrere Unterprogramme enthält. Die Reflexsuche erfolgte mit dem Unterprogramm *XDISPLAYF*, das Diffraktionsaufnahmen optisch darstellt. Das Unterprogramm *DENZO* indizierte die identifizierten Reflexe und verfeinerte verschiedene Parameter wie Kristallorientierung, die Lage des Primärstrahls, die Länge der Gitterachsen, die Gitterwinkel und die Detektorausrichtung, bis das Reflexmuster geometrisch erklärbar war. Nicht verfeinert, aber iterativ angepasst wurde die Mosaizität und die mittlere Größe der Reflexe auf dem Detektor. Anschließend wurde für die weitere Auswertung die Intensitäten der Reflexe auf den einzelnen Beugungsbildern durch Integration bestimmt. Nach der Datenintegration wurden die Intensitäten aller Reflexe der einzelnen Beugungsaufnahmen mit dem Unterprogramm *SCALEPACK* relativ zueinander skaliert. Anschließend wurde die Vollständigkeit des Datensatzes sowie die Redundanz der Reflexe (die mittlere Anzahl der Messungen jedes Reflexes) getrennt nach den Auflösungsschalen analysiert. Durch die Bestimmung des R_{sym} -Wertes in den einzelnen Schalen konnte die Qualität des Datensatzes beurteilt werden (Gleichung 4).

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} |I_{\text{hkl}(n)} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle|}{\sum_n |I_{\text{hkl}(n)}|} \quad \text{Gl. 4}$$

Dabei stellt $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ die mittlere Intensität sowie $I_{\text{hkl}(n)}$ die n-te gemessene und skalierte Intensität des Reflexes hkl bzw. seiner Symmetrieverwandten dar. Für die optimale Datenprozessierung ist eine möglichst exakte Abschätzung des Messfehlers in den einzelnen Auflösungsschalen erforderlich. Die χ^2 -Verteilung (Gleichung 5) ist ein wichtiges Kriterium für die Signifikanz des geschätzten Fehlers (E) und nimmt bei guter Fehlerschätzung Werte von ca. 1.0 an.

$$\chi^2 = \frac{\sum_n |I_{\text{hkl}(n)} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle|^2}{\sum_n E^2 \frac{n}{n-1}} \quad \text{Gl. 5}$$

Zur Bestimmung der Strukturfaktoramplituden aus den Intensitäten der aufgenommenen Reflexe wurde das Programm *TRUNCATE* (French & Wilson, 1978) aus dem Programmpaket *CCP4* (CCP4, 1994) angewandt. Dabei sind die Reflexintensitäten dem Betrag der Strukturfaktoramplituden zum Quadrat proportional.

5.6.5 Bestimmung des Matthews-Koeffizienten

Aus dem Volumen der Elementarzelle und dem Molekulargewicht der in der Elementarzelle vorhandenen Proteine kann der sogenannte Matthews-Koeffizient (V_m) berechnet werden, der eine Abschätzung der Anzahl der Moleküle pro asymmetrischer Einheit zulässt (Matthews, 1968). Der Matthews-Koeffizient liegt bei Proteinen typischerweise bei $2.6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$, was einem Lösungsmittelgehalt von 50 % entspricht.

$$V_m = \frac{V_{EZ}}{Mr \cdot Z}$$

Gl. 6

V_{EZ} = Volumen der Elementarzelle [\AA^3]

Mr = Molekulargewicht des Proteins [Da]

Z = Anzahl der Proteinmoleküle pro asymmetrischer Einheit

5.6.6 Strukturlösung mittels Molekularem Ersatz

Die aus den Beugungsbildern ermittelten Reflexintensitäten erlauben es, die Amplitude der Röntgenwelle zu bestimmen. Eine Welle ist jedoch neben den bekannten Größen Wellenlänge und Amplitude erst durch Kenntnis der Phase eindeutig charakterisiert. Da bei der Messung die Phaseninformation verloren geht (sog. Phasenproblem), müssen Abschätzungen der Phasen gefunden werden, die sich im Verlaufe der Verfeinerung den tatsächlichen Phasen annähern. Es gibt verschiedene Methoden, um die nötige Phaseninformation zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde die Methode des Molekularen Ersatzes durchgeführt.

Existiert eine zur Zielstruktur verwandte Struktur (z. B. ein strukturell homologes Protein), kann die Zielstruktur mit der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst werden. Proteine mit einer Sequenzidentität von mehr als 20 % weisen eine meist ähnliche räumliche Struktur auf (Sander & Schneider, 1991). Der Molekulare Ersatz wurde mit Hilfe des Programms *EPMR* (Kissinger *et al.*, 1999) angewandt.

Aus den Koordinaten der bekannten Struktur können die Strukturfaktoramplituden (F_{calc}) und die Phasen für das Modell berechnet werden. Normalerweise unterscheiden sich sowohl Raumgruppe als auch die Orientierung des Proteins in der bekannten und der unbekannten Kristallstruktur. Daher wird das bekannte Suchmodell erst zufällig in der neuen Elementarzelle platziert. Um das Modell in räumliche Übereinstimmung mit der unbekannten Struktur zu bringen, müssen sowohl Rotationen des Modells um drei Winkel als auch Translationen, beschrieben durch drei Vektoren, und ihre Kombinationen für die Suche nach der besten Übereinstimmung ausprobiert werden. Anders als beim klassischen Molekularen Ersatz werden mit dem Programm *EPMR* die sechs Variablen gleichzeitig ermittelt. Dazu wird in jeder Runde eine zufällige Molekülorientierung und –platzierung

gewählt, die dann iterativ optimiert wird. Die Güte einer Lösung wird anhand der Korrelation zwischen den gemessenen Strukturfaktoramplituden und den berechneten Strukturfaktoramplituden des Modells bewertet.

5.6.7 Modellbau und –verfeinerung

Die ersten Phasennäherungen, die aus dem durch Molekularen Ersatz orientiertem Modell ermittelt wurden, müssen in einem iterativen Verfahren den tatsächlichen Phasen angenähert werden. Dazu wird mit den Phasen α_{hkl} des Modells und den gemessenen Strukturfaktor-amplituden eine Elektronendichtefunktion $\rho(x,y,z)$, die die Elektronendichteverteilung der Elementarzelle beschreibt, analog zu Gleichung 7 berechnet.

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}|_{\text{obs}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha_{hkl}^{\text{Modell}})} \quad \text{Gl. 7}$$

Die visuelle Darstellung der Elektronendichte und des Proteinmodells erfolgte mit Hilfe des Programms *O* (Jones *et al.*, 1991). Die erste Elektronendichtekarte wurde aus den Phasen des Modells berechnet und wird demzufolge stark von diesem Modell beeinflusst („*model bias*“). Um diese Beeinflussung zu minimieren, werden sogenannte $2F_O-F_C$ -Karten dargestellt, bei der die gemessenen Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) stärker gewichtet werden als die von dem aktuellen Modell berechneten (F_{calc}). Gleichung 8 zeigt die Berechnung der $2F_O-F_C$ -Karte.

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |2|\vec{F}_{\text{obs}}| - |\vec{F}_{\text{calc}}|| \cdot e^{-2\pi i(hx+ky+lz-\alpha_{hkl}^{\text{Modell}})} \quad \text{Gl. 8}$$

Eine weitere Elektronendichtekarte, die sog. F_O-F_C -Karte, zeigt Abweichungen der gemessenen Strukturfaktoramplituden von denen des aktuellen Modells an. Durch die Verwendung dieser Karten ist es möglich, das verwendete Modell gezielt an die im Experiment bestimmten Messwerte anzupassen.

Die Qualität der Modellstruktur wurde durch zyklische Änderungen des Modells und nachfolgende Verfeinerung an stereochemische Parameter mit dem Programm *REFMAC* (Murshudov *et al.*, 1997) verbessert. Als Maß für die Verbesserung der Daten galt dabei der konventionelle R-Faktor (Gleichung 9): er beschreibt den Korrelationsgrad zwischen F_{obs} und F_{calc} und wurde im Laufe der Verfeinerung minimiert (Engh & Huber, 1991).

$$R = \frac{\sum_{hkl} \left| |\vec{F}_{hkl}|_{\text{obs}} - |\vec{F}_{hkl}|_{\text{calc}} \right|}{\sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}|_{\text{obs}}} \quad \text{Gl. 9}$$

R	= R-Faktor
h, k, l	= Miller'sche Indizes
$ \vec{F}_{hkl} _{\text{obs}}$	= gemessene Strukturfaktoramplitude der Netzebene hkl
$ \vec{F}_{hkl} _{\text{calc}}$	= berechnete Strukturfaktoramplitude der Netzebene hkl

Um die Qualität einer Struktur unabhängig von der Verfeinerungsmethode verfolgen zu können, wurde der sogenannte freie R-Faktor eingeführt. Dieser wird ebenso wie der konventionelle R-Faktor berechnet, aber es werden nur etwa 5 % der gemessenen Reflexe verwendet, welche nicht in den Prozess der Strukturverfeinerung einbezogen werden. Dieser freie R-Faktor stellt somit ein objektives Maß für die Qualität des Strukturmodells dar (Brünger, 1992).

Nachdem alle Seitenketten korrekt modelliert waren, wurden Wassermoleküle in das Modell eingefügt. Dies erfolgte mit dem Programm *ARP/WARP* (Lamzin & Wilson, 1997).

5.6.8 Analyse von Strukturmodellen

Die Konformationsanalyse mit dem aus *PROCHECK*-generierten Ramachandran-Plot ist ein wichtiges Kriterium zur Qualitätsabschätzung. Die dihedralen Hauptkettentorsionswinkel ϕ und ψ um das C_α -Kohlenstoffatom weisen für die verschiedenen Sekundärstrukturelemente charakteristische Werte auf, die einer energetisch günstigen Konformation entsprechen (Ramachandran & Sasisekharan, 1968). Bei einem guten Proteinmodell sollten die Hauptkettentorsionswinkel weitestgehend im energetisch günstigen Bereich liegen.

Die Überprüfung der Proteinstruktur auf Abweichungen von Idealwerten der unterschiedlichen Parameter, wie Bindungslängen und -winkeln, Planarität bestimmter Atomgruppen u.a. ist für die Einschätzung der stereochemischen Qualität eines Proteinmodells bedeutend (Morris *et al.*, 1992). Entsprechende Konformationsanalysen wurden durch die Programme *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993) und *WHATIF* (Vriend, 1990) ausgeführt.

Inter- und intramolekulare Kontakte wurden mit *CONTACT* (CCP4, 1994) bestimmt, dabei wurde, wenn nicht anders erwähnt, für einen interatomaren Kontakt in Übereinstimmung mit der Programm-Dokumentation ein maximaler Abstand von 3.5 Å zugrunde gelegt.

5.6.9 Erstellen von Abbildungen

Um die erhaltenen Strukturen graphisch darzustellen, wurden die Programme *MOLSCRIPT* (Kraulis, 1991), *BOBSCRIPT* (Esnouf, 1999) und *RASTER3D* (Merrit & Bacon, 1997) verwendet. Proteinoberflächen wurden mit dem Programm *GRASP* (Nicholls *et al.*, 1993) berechnet und dargestellt. Die mit

MolScript angefertigten Abbildungen wurden anschließend mit den Programmen *gl_render* und *PovRay* optisch aufbereitet. Als ein weiteres Programm zur Darstellung von Abbildungen (speziell bei der C3stau2-Studie) wurde *PyMOL* (<http://pymol.sourceforge.net>) verwendet.

Die Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm *STRIDE* berechnet. Der Darstellung von homologen Proteinen lagen die jeweiligen PDB-Dateien aus der NCBI-Datenbank zugrunde.

5.6.10 Strukturvergleich

Zum Vergleich mit verwandten Strukturen wurden strukturbasierte Überlagerungen mit den Programmen *DALI* (Holm & Sander, 1998) und *LSQKAP* (CCP4, 1994) durchgeführt. Für Überlagerungen mit *LSQKAP* wurden nur C $_{\alpha}$ -Atompositionen verwendet, die eine Standardabweichung kleiner 3 Å hatten. Strukturbasierte Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm *ESPrpt* generiert.

Literaturverzeichnis

- Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Sugai, M. & Weber, P.C. (1997) Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 1623-1629.
- Akiyama, H., Ueda, M., Kanzaki, H., Tada, J. & Arata, J. (1997) Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from impetigo and furuncle: role of fibrinogen and fibrin. *J Dermatol Sci* **16**: 2-10.
- Aktories, K., Rosener, S., Blaschke, U. & Chhatwal, G.S. (1988) Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. *Eur J Biochem* **172**: 445-450.
- Aktories, K. & Barbieri, J.T. (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* **8**: 8.
- Appel, M. (2001) Aufreinigungs- und DNA-Substitutionsversuche an PrfA aus *Listeria monocytogenes*. *Studienarbeit, GBF*.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M. & Iyer, L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 231-262.
- Arndt, U.W. & Wonacott, A.J. (1977) The Rotation Method in Crystallography: *Amsterdam: North-Holland*.
- Baichoo, N. & Heyduk, T. (1999) Mapping cyclic nucleotide-induced conformational changes in cyclicAMP receptor protein by a protein footprinting technique using different chemical proteases. *Protein Sci* **8**: 518-528.
- Balaban, N. & Rasooly, A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* **61**: 1-10.
- Barbieri, J.T. & Sun, J. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 79-92.
- Barth, H., Preiss, J.C., Hofmann, F. & Aktories, K. (1998) Characterization of the catalytic site of the ADP-ribosyltransferase *Clostridium botulinum* C2 toxin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **273**: 29506-29511.
- Behari, J. & Youngman, P. (1998) Regulation of hly expression in *Listeria monocytogenes* by carbon sources and pH occurs through separate mechanisms mediated by PrfA. *Infect Immun* **66**: 3635-3642.
- Benoff, B., Yang, H., Lawson, C.L., Parkinson, G., Liu, J., Blatter, E., Ebright, Y.W., Berman, H.M. & Ebright, R.H. (2002) Structural basis of transcription activation: the CAP- α CTD-DNA complex. *Science* **297**: 1562-1566.
- Bishop, A.L. & Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348**: 241-255.
- Böckmann, R., Dickneite, C., Goebel, W. & Böhne, J. (2000) PrfA mediates specific binding of RNA polymerase of *Listeria monocytogenes* to PrfA-dependent virulence gene promoters resulting in a transcriptionally active complex. *Mol Microbiol* **36**: 487-497.
- Böhne, J., Sokolovic, Z. & Goebel, W. (1994) Transcriptional regulation of prfA and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **11**: 1141-1150.
- Böhne, J., Kestler, H., Uebele, C., Sokolovic, Z. & Goebel, W. (1996) Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA. *Mol Microbiol* **20**: 1189-1198.
- Boquet, P. & Lemichez, E. (2003) Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends Cell Biol* **13**: 238-246.
- Brehm, K., Kreft, J., Ripio, M.T. & Vazquez-Boland, J.A. (1996) Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. *Microbiologia* **12**: 219-236.

- Brennan, R.G. (1993) The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell* **74**: 773-776.
- Brünger, A.T. (1992) The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**: 472-474.
- Bubert, A., Kestler, H., Gotz, M., Böckmann, R. & Goebel, W. (1997) The *Listeria monocytogenes* iap gene as an indicator gene for the study of PrfA-dependent regulation. *Mol Gen Genet* **256**: 54-62.
- Cameron, L.A., Footer, M.J., van Oudenaarden, A. & Theriot, J.A. (1999) Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4908-4913.
- Camilli, A., Tilney, L.G. & Portnoy, D.A. (1993) Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol* **8**: 143-157.
- CCP4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst D* **50**: 760-763.
- Chakraborty, T., Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Hartl, M., Goebel, W., Nichterlein, T. & Notermans, S. (1992) Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the prfA gene. *J Bacteriol* **174**: 568-574.
- Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R., Rubin, E.J. & Gill, D.M. (1989) The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *Embo J* **8**: 1087-1092.
- Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scortti, M., Slaghuis, J., Goebel, W. & Vazquez-Boland, J.A. (2002) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 431-436.
- Collier, R.J. (2001) Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* **39**: 1793-1803.
- Cossart, P. & Bierne, H. (2001) The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Curr Opin Immunol* **13**: 96-103.
- Coye, L.H. & Collins, C.M. (2004) Identification of SpyA, a novel ADP-ribosyltransferase of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **54**: 89-98.
- Czech, A., Yamaguchi, T., Bader, L., Linder, S., Kaminski, K., Sugai, M. & Aepfelbacher, M. (2001) Prevalence of Rho-inactivating epidermal cell differentiation inhibitor toxins in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J Infect Dis* **184**: 785-788.
- Dai, J., Lin, S.H., Kemmis, C., Chin, A.J. & Lee, J.C. (2004) Interplay between site-specific mutations and cyclic nucleotides in modulating DNA recognition by *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *Biochemistry* **43**: 8901-8910.
- Davies, D.R. & Segal, D.M. (1971) Protein crystallization: Micro techniques involving vapour diffusion. *Methods Enzymol* **22**: 253ff.
- de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**: 474-477.
- Dickneite, C., Böckmann, R., Spory, A., Goebel, W. & Sokolovic, Z. (1998) Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. *Mol Microbiol* **27**: 915-928.
- Diller, T.C., Madhusudan, Xuong, N.-H. & Taylor, S.S. (2001) Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II[beta] regulatory subunit. *Structure with Folding & Design* **9**: 73-82.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M. & Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13**: 16-34.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M. & Chakraborty, T. (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *Embo J* **11**: 1981-1990.

- Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. & Cossart, P. (1993) Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator prfA. *Mol Microbiol* **9**: 931-941.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. & Cossart, P. (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**: 251-261.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P. & Cossart, P. (2002) *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Mol Microbiol* **45**: 1095-1106.
- Dvorsky, R., Blumenstein, L., Vetter, I.R. & Ahmadian, M.R. (2004) Structural insights into the interaction of ROCKI with the switch regions of RhoA. *J Biol Chem* **279**: 7098-7104.
- Ebright, R.H., Ebright, Y.W. & Gunasekera, A. (1989) Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site. *Nucleic Acids Res* **17**: 10295-10305.
- Edelson, B.T. & Unanue, E.R. (2000) Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol* **12**: 425-431.
- Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W. & Sokolovic, Z. (1996) A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* **21**: 823-837.
- Engh, R.A. & Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst A* **47**: 392-400.
- Ermolaeva, S., Novella, S., Vega, Y., Ripio, M.T., Scortti, M. & Vazquez-Boland, J.A. (2004) Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. *Mol Microbiol* **52**: 601-611.
- Esnouf, R.M. (1999) Further additions to MolScript version 1.4, including reading and contouring of electron-density maps. *Acta Cryst D* **55**: 938-940.
- Evans, H.R., Sutton, J.M., Holloway, D.E., Ayriss, J., Shone, C.C. & Acharya, K.R. (2003) The crystal structure of C3stau2 from *Staphylococcus aureus* and its complex with NAD. *J. Biol. Chem.*: 45924-45930.
- Fagerstam, L.G., Frostell-Karlsson, A., Karlsson, R., Persson, B. & Ronnberg, I. (1992) Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr* **597**: 397-410.
- Farber, J.M. & Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**: 476-511.
- Finelli, A., Kerksiek, K.M., Allen, S.E., Marshall, N., Mercado, R., Pilip, I., Busch, D.H. & Pamer, E.G. (1999) MHC class I restricted T cell responses to *Listeria monocytogenes*, an intracellular bacterial pathogen. *Immunol Res* **19**: 211-223.
- Foster, R., Hu, K.Q., Lu, Y., Nolan, K.M., Thissen, J. & Settleman, J. (1996) Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol* **16**: 2689-2699.
- Freitag, N.E., Youngman, P. & Portnoy, D.A. (1992) Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**: 1293-1298.
- Freitag, N.E., Rong, L. & Portnoy, D.A. (1993) Regulation of the prfA transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **61**: 2537-2544.
- Freitag, N.E. & Portnoy, D.A. (1994) Dual promoters of the *Listeria monocytogenes* prfA transcriptional activator appear essential in vitro but are redundant in vivo. *Mol Microbiol* **12**: 845-853.

- French, G.S. & Wilson, K.S. (1978) On the treatment of negative intensity observations. *Acta Cryst A* **34**: 517-525.
- Fujihara, H., Walker, L.A., Gong, M.C., Lemichez, E., Boquet, P., Somlyo, A.V. & Somlyo, A.P. (1997) Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vivo ADP-ribosylation with the chimeric toxin DC3B. *Mol Biol Cell* **8**: 2437-2447.
- Gaillard, J.L., Berche, P. & Sansonetti, P. (1986) Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **52**: 50-55.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127-1141.
- Gajiwala, K.S. & Burley, S.K. (2000) Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**: 110-116.
- Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G. & Portnoy, D.A. (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**: 999-1003.
- Gellin, B.G. & Broome, C.V. (1989) Listeriosis. *Jama* **261**: 1313-1320.
- Genth, H., Gerhard, R., Maeda, A., Amano, M., Kaibuchi, K., Aktories, K. & Just, I. (2003) Entrapment of Rho ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme in the Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor-1 complex. *J Biol Chem* **278**: 28523-28527.
- Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E. & Berche, P. (1987) Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **55**: 1641-1646.
- Godsey, M.H., Baranova, N.N., Neyfakh, A.A. & Brennan, R.G. (2001) Crystal structure of MtaN, a global multidrug transporter gene activator. *J Biol Chem* **276**: 47178-47184.
- Greene, C., McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P.E., Lew, D.P. & Foster, T.J. (1995) Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of fnb genes. *Mol Microbiol* **17**: 1143-1152.
- Hagelüken, G. (2004) Untersuchungen zur Struktur der Mutante G145S des Virulenzaktivators PrfA aus *Listeria monocytogenes* im Komplex mit DNA. *Diplomarbeit, GBF*.
- Hamill, R.J., Vann, J.M. & Proctor, R.A. (1986) Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun* **54**: 833-836.
- Han, S., Craig, J.A., Putnam, C.D., Carozzi, N.B. & Tainer, J.A. (1999) Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat Struct Biol* **6**: 932-936.
- Han, S., Arvai, A.S., Clancy, S.B. & Tainer, J.A. (2001) Crystal structure and novel recognition motif of rho ADP-ribosylating C3 exoenzyme from *Clostridium botulinum*: structural insights for recognition specificity and catalysis. *J Mol Biol* **305**: 95-107.
- Han, S. & Tainer, J.A. (2002) The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases. *Int J Med Microbiol* **291**: 523-529.
- Harman, J.G., McKenney, K. & Peterkofsky, A. (1986) Structure-function analysis of three cAMP-independent forms of the cAMP receptor protein. *J Biol Chem* **261**: 16332-16339.
- Harman, J.G. (2001) Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta* **1547**: 1-17.
- Herler, M., Bubert, A., Goetz, M., Vega, Y., Vazquez-Boland, J.A. & Goebel, W. (2001) Positive selection of mutations leading to loss or reduction of transcriptional activity

- of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* virulence. *J. Bacteriol.* **183**: 5562-5570.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. & Ito, T. (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **9**: 486-493.
- Hoffmann, C., Pop, M., Leemhuis, J., Schirmer, J., Aktories, K. & Schmidt, G. (2004) The *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxic necrotizing factor (CNFY) selectively activates RhoA. *J Biol Chem* **279**: 16026-16032.
- Holbourn, K.P., Sutton, J.M., Evans, H.R., Shone, C.C. & Acharya, K.R. (2005) Molecular recognition of an ADP-ribosylating *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme by RalA GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5357-5362.
- Holm, L. & Sander, C. (1998) Touring protein fold space with DALI/FSSP. *Nucleic Acids Res* **26**: 316-319.
- Hueck, C.J. & Hillen, W. (1995) Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* **15**: 395-401.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T. (1998) Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem* **273**: 9656-9666.
- Inoue, S., Sugai, M., Murooka, Y., Paik, S.Y., Hong, Y.M., Ohgai, H. & Suginaka, H. (1991) Molecular cloning and sequencing of the epidermal cell differentiation inhibitor gene from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **174**: 459-464.
- Jaffe, A.B. & Hall, A. (2002) Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* **84**: 57-80.
- Jancarik, J. & Kim, S.H. (1991) Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization or pro-teins. *J. Appl. Cryst.* **24**: 409-411.
- Joachimiak, A., Marmorstein, R.Q., Schevitz, R.W., Mandecki, W., Fox, J.L. & Sigler, P.B. (1987) Crystals of the trp repressor-operator complex suitable for X-ray diffraction analysis. *J Biol Chem* **262**: 4917-4921.
- Joachimiak, A. & Sigler, P.B. (1991) Crystallization of protein-DNA complexes. *Methods Enzymol* **208**: 82-99.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M. & Cossart, P. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110**: 551-561.
- Jordan, S.R., Whitcombe, T.V., Berg, J.M. & Pabo, C.O. (1985) Systematic variation in DNA length yields highly ordered repressor-operator cocrystals. *Science* **230**: 1383-1385.
- Junttila, J.R., Niemela, S.I. & Hirn, J. (1988) Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol* **65**: 321-327.
- Just, I., Mohr, C., Schallehn, G., Menard, L., Didsbury, J.R., Vandekerckhove, J., van Damme, J. & Aktories, K. (1992) Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium limosum*. *J Biol Chem* **267**: 10274-10280.
- Just, I., Selzer, J., Jung, M., van Damme, J., Vandekerckhove, J. & Aktories, K. (1995a) Rho-ADP-ribosylating exoenzyme from *Bacillus cereus*. Purification, characterization, and identification of the NAD-binding site. *Biochemistry* **34**: 334-340.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M. & Aktories, K. (1995b) Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* **375**: 500-503.
- Just, I., Hofmann, F., Genth, H. & Gerhard, R. (2001) Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. *Int J Med Microbiol* **291**: 243-250.
- Karunasagar, I., Lampidis, R., Goebel, W. & Kreft, J. (1997) Complementation of *Listeria seeligeri* with the plcA-prfA genes from *L. monocytogenes* activates transcription of

- seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* **146**: 303-310.
- Kissinger, C.R., Gehlhaar, D.K. & Fogel, D.B. (1999) Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Cryst D* **55**: 484-491.
- Klarsfeld, A.D., Goossens, P.L. & Cossart, P. (1994) Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: plcA, purH, purD, pyrE and an arginine ABC transporter gene, arpJ. *Mol Microbiol* **13**: 585-597.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1992) *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* **68**: 521-531.
- Körner, H., Sofia, H.J. & Zumft, W.G. (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 559-592.
- Kraulis, P.J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **24**: 946-950.
- Kreft, J. & Vazquez-Boland, J.A. (2001) Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **291**: 145-157.
- Ladhani, S., Joannou, C.L., Lochrie, D.P., Evans, R.W. & Poston, S.M. (1999) Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* **12**: 224-242.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lampidis, R., Gross, R., Sokolovic, Z., Goebel, W. & Kreft, J. (1994) The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Mol Microbiol* **13**: 141-151.
- Lamzin, V.S. & Wilson, K.S. (1997) [14] Automated refinement for protein crystallography. *Methods Enzymol* **277**: 269-305.
- Lanzilotta, W.N., Schuller, D.J., Thorsteinsson, M.V., Kerby, R.L., Roberts, G.P. & Poulos, T.L. (2000) Structure of the CO sensing transcription activator CooA. *Nat Struct Biol* **7**: 876-880.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* **26**: 283-291.
- Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A., Berman, H.M. & Ebright, R.H. (2004) Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 10-20.
- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W. & Chakraborty, T. (1990) Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 8336-8340.
- Leimeister-Wächter, M., Domann, E. & Chakraborty, T. (1991) Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **5**: 361-366.
- Leslie, A.G. (1992) Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography: *Daresbury Laboratory, Warrington, United Kingdom*.
- Li, M., Dyda, F., Benhar, I., Pastan, I. & Davies, D.R. (1996) Crystal structure of the catalytic domain of *Pseudomonas* exotoxin A complexed with a nicotinamide adenine dinucleotide analog: implications for the activation process and for ADP ribosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6902-6906.
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1995) Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun* **63**: 3896-3903.

- Lingnau, A., Chakraborty, T., Niebuhr, K., Domann, E. & Wehland, J. (1996) Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect Immun* **64**: 1002-1006.
- Longenecker, K., Read, P., Derewenda, U., Dauter, Z., Liu, X., Garrard, S., Walker, L., Somlyo, A.V., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.P. & Derewenda, Z.S. (1999) How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**: 1503-1515.
- Lorber, B. (1997) Listeriosis. *Clin Infect Dis* **24**: 1-9.
- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K. & Hakoshima, T. (1999) The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol Cell* **4**: 793-803.
- Martin, S.E., Flowers, R.S. & Ordal, Z.J. (1976) Catalase: its effect on microbial enumeration. *Appl Environ Microbiol* **32**: 731-734.
- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y. & Horiguchi, Y. (2000) Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *Embo J* **19**: 521-530.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology* **33**: 491-497.
- McDevitt, D., Nanavaty, T., House-Pompeo, K., Bell, E., Turner, N., McIntire, L., Foster, T. & Hook, M. (1997) Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* **247**: 416-424.
- Menetrey, J., Flatau, G., Stura, E.A., Charbonnier, J.B., Gas, F., Teulon, J.M., Le Du, M.H., Boquet, P. & Menez, A. (2002) NAD binding induces conformational changes in Rho ADP-ribosylating *clostridium botulinum* C3 exoenzyme. *J Biol Chem* **277**: 30950-30957.
- Mengaud, J., Vicente, M.F. & Cossart, P. (1989) Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes* hlyA region reveal structural features that may be involved in regulation. *Infect Immun* **57**: 3695-3701.
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.A., Milon, G. & Cossart, P. (1991) Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* **5**: 2273-2283.
- Menzies, B.E. & Kourteva, I. (1998) Internalization of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immun* **66**: 5994-5998.
- Merrit, E.A. & Bacon, D.J. (1997) Raster 3d-photorealistic molecular graphics. *Methods in Enzymology* **277**: 505-524.
- Milenbachs, A.A., Brown, D.P., Moors, M. & Youngman, P. (1997) Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **23**: 1075-1085.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppee, J.-Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vazquez-Boland, J.A., Kunst, F., Cossart, P. & Buchrieser, C. (2003) Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* **47**: 1613-1625.
- Moors, M.A., Levitt, B., Youngman, P. & Portnoy, D.A. (1999) Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **67**: 131-139.
- Morris, A.L., MacArthur, M.W., Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. (1992) Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **12**: 345-364.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst D* **53**: 240-255.
- Nemoto, Y., Namba, T., Kozaki, S. & Narumiya, S. (1991) *Clostridium botulinum* C3 ADP-ribosyltransferase gene. Cloning, sequencing, and expression of a functional protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 19312-19319.

- Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. (1993) Grasp: a graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.* **64**: A166.
- Nobes, C.D., Lauritzen, I., Mattei, M.G., Paris, S., Hall, A. & Chardin, P. (1998) A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* **141**: 187-197.
- Oppenheimer, N.J. (1994) NAD hydrolysis: chemical and enzymatic mechanisms. *Mol Cell Biochem* **138**: 245-251.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A, Methods in Enzymology* **276**: 307-326.
- Palmqvist, N., Foster, T., Tarkowski, A. & Josefsson, E. (2002) Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microb Pathog* **33**: 239-249.
- Pankiewicz, K.W., Watanabe, K.A., Lesiak-Watanabe, K., Goldstein, B.M. & Jayaram, H.N. (2002) The chemistry of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) analogues containing C-nucleosides related to nicotinamide riboside. *Curr Med Chem* **9**: 733-741.
- Parkinson, G., Wilson, C., Gunasekera, A., Ebright, Y.W., Ebright, R.E. & Berman, H.M. (1996) Structure of the CAP-DNA Complex at 2.5 Å Resolution: A Complete Picture of the Protein-DNA Interface. *Journal of Molecular Biology* **260**: 395-408.
- Passner, J.M., Schultz, S.C. & Steitz, T.A. (2000) Modeling the cAMP-induced allosteric transition using the crystal structure of CAP-cAMP at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* **304**: 847-859.
- Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K. & Hall, A. (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* **111**: 1001-1007.
- Patikoglou, G.A., Kim, J.L., Sun, L., Yang, S.H., Kodadek, T. & Burley, S.K. (1999) TATA element recognition by the TATA box-binding protein has been conserved throughout evolution. *Genes Dev* **13**: 3217-3230.
- Popoff, M.R., Hauser, D., Boquet, P., Eklund, M.W. & Gill, D.M. (1991) Characterization of the C3 gene of *Clostridium botulinum* types C and D and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **59**: 3673-3679.
- Portnoy, D.A., Jacks, P.S. & Hinrichs, D.J. (1988) Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med* **167**: 1459-1471.
- Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W. & Cossart, P. (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* **60**: 1263-1267.
- Pragman, A.A. & Schlievert, P.M. (2004) Virulence regulation in *Staphylococcus aureus*: the need for in vivo analysis of virulence factor regulation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **42**: 147-154.
- Ramachandran, G.N. & Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**: 283-438.
- Rauch, M., Luo, Q., Muller-Altroch, S. & Goebel, W. (2005) SigB-dependent in vitro transcription of prfA and some newly identified genes of *Listeria monocytogenes* whose expression is affected by PrfA in vivo. *J Bacteriol* **187**: 800-804.
- Rehmann, H., Prakash, B., Wolf, E., Rueppel, A., De Rooij, J., Bos, J.L. & Wittinghofer, A. (2003) Structure and regulation of the cAMP-binding domains of Epac2. *Nat Struct Biol* **10**: 26-32.
- Renzoni, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S. & Cossart, P. (1997) Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect Immun* **65**: 1515-1518.
- Renzoni, A., Cossart, P. & Dramsi, S. (1999) PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. *Mol Microbiol* **34**: 552-561.

- Ridley, A. (2000) Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J Cell Biol* **150**: F107-109.
- Ripio, M.T., Dominguez-Bernal, G., Suarez, M., Brehm, K., Berche, P. & Vazquez-Boland, J.A. (1996) Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res Microbiol* **147**: 371-384.
- Ripio, M.T., Brehm, K., Lara, M., Suarez, M. & Vazquez-Boland, J.A. (1997a) Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. *J Bacteriol* **179**: 7174-7180.
- Ripio, M.T., Dominguez-Bernal, G., Lara, M., Suarez, M. & Vazquez-Boland, J.A. (1997b) A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **179**: 1533-1540.
- Ritter, H., Koch-Nolte, F., Marquez, V.E. & Schulz, G.E. (2003) Substrate binding and catalysis of ecto-ADP-ribosyltransferase 2.2 from rat. *Biochemistry* **42**: 10155-10162.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Smerdon, S.J. & Gamblin, S.J. (1997) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* **389**: 758-762.
- Rocourt, J. (1988) Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection* **16**: S89-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual.: Cold Spring Harbour Press, USA.
- Sander, C. & Schneider, R. (1991) Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* **9**: 56-68.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schlech, W.F. (2000) Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* **31**: 770-775.
- Schultz, S.C., Shields, G.C. & Steitz, T.A. (1990) Crystallization of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein with its DNA binding site. The use of modular DNA. *J Mol Biol* **213**: 159-166.
- Schultz, S.C., Shields, G.C. & Steitz, T.A. (1991) Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253**: 1001-1007.
- Seeliger, H.P. (1984) Modern taxonomy of the *Listeria* group relationship to its pathogenicity. *Clin Invest Med* **7**: 217-221.
- Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E. & Aktories, K. (1998) Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* **37**: 5296-5304.
- Sekine, A., Fujiwara, M. & Narumiya, S. (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **264**: 8602-8605.
- Self, A.J. & Hall, A. (1995) Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **256**: 3-10.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T. & Cossart, P. (1995) Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J Bacteriol* **177**: 6469-6476.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Ebright, R. & Cossart, P. (1996) A single substitution in the putative helix-turn-helix motif of the pleiotropic activator PrfA attenuates *Listeria monocytogenes* virulence. *Mol Microbiol* **20**: 785-797.
- Shetron-Rama, L.M., Marquis, H., Bouwer, H.G. & Freitag, N.E. (2002) Intracellular induction of *Listeria monocytogenes* actA expression. *Infect Immun* **70**: 1087-1096.
- Silin, V. & Plant, A. (1997) Biotechnological applications of surface plasmon resonance. *Trends in Biotechnology* **15**: 353-359.

- Simpson, L.L., Stiles, B.G., Zepeda, H.H. & Wilkins, T.D. (1987) Molecular basis for the pathological actions of *Clostridium perfringens* iota toxin. *Infect Immun* **55**: 118-122.
- Skoble, J., Auerbuch, V., Goley, E.D., Welch, M.D. & Portnoy, D.A. (2001) Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol* **155**: 89-100.
- Skogberg, K., Syrjänen, J., Jähkola, M., Renkonen, O.V., Paavonen, J., Ahonen, J., Kontiainen, S., Ruutu, P. & Valtonen, V. (1992) Clinical presentation and outcome of listeriosis in patients with and without immunosuppressive therapy. *Clin Infect Dis* **14**: 815-821.
- Snyder, J.T., Worthylake, D.K., Rossman, K.L., Betts, L., Pruitt, W.M., Siderovski, D.P., Der, C.J. & Sondek, J. (2002) Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol* **9**: 468-475.
- Soisson, S.M., MacDougall-Shackleton, B., Schleif, R. & Wolberger, C. (1997) Structural basis for ligand-regulated oligomerization of AraC. *Science* **276**: 421-425.
- Spangler, B.D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**: 622-647.
- Sugai, M., Enomoto, T., Hashimoto, K., Matsumoto, K., Matsuo, Y., Ohgai, H., Hong, Y.M., Inoue, S., Yoshikawa, K. & Suginaka, H. (1990) A novel epidermal cell differentiation inhibitor (EDIN): purification and characterization from *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **173**: 92-98.
- Sugai, M., Hashimoto, K., Kikuchi, A., Inoue, S., Okumura, H., Matsumoto, K., Goto, Y., Ohgai, H., Moriishi, K., Syuto, B. & et al. (1992) Epidermal cell differentiation inhibitor ADP-ribosylates small GTP-binding proteins and induces hyperplasia of epidermis. *J Biol Chem* **267**: 2600-2604.
- Sun, J., Maresso, A.W., Kim, J.J. & Barbieri, J.T. (2004) How bacterial ADP-ribosylating toxins recognize substrates. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 868-876.
- Tan, S., Hunziker, Y., Pellegrini, L. & Richmond, T.J. (2000) Crystallization of the yeast MAT α 2/MCM1/DNA ternary complex: general methods and principles for protein/DNA cocrystallization. *J Mol Biol* **297**: 947-959.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. & Yonemoto, W. (1990) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **59**: 971-1005.
- Thirumuruhan, R., Rajashankar, K., Fedorov, A.A., Dodatko, T., Chance, M.R., Cossart, P. & Almo, S.C. (2003) Crystal structure of PrfA, the transcriptional regulator in *Listeria monocytogenes*: Protein Data Bank accession code 1OMI (www.rcsb.org/pdb).
- Tilney, L.G. & Portnoy, D.A. (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* **109**: 1597-1608.
- Todd, J.K. (1988) Toxic shock syndrome. *Clin Microbiol Rev* **1**: 432-446.
- Tsuge, H., Nagahama, M., Nishimura, H., Hisatsune, J., Sakaguchi, Y., Itogawa, Y., Katunuma, N. & Sakurai, J. (2003) Crystal structure and site-directed mutagenesis of enzymatic components from *Clostridium perfringens* iota-toxin. *J Mol Biol* **325**: 471-483.
- Urano, T., Emkey, R. & Feig, L.A. (1996) Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *Embo J* **15**: 810-816.
- Vega, Y., Dickneite, C., Ripio, M.-T., Bockmann, R., Gonzalez-Zorn, B., Novella, S., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W. & Vazquez-Boland, J.A. (1998) Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J. Bacteriol.* **180**: 6655-6660.

- Vega, Y., Rauch, M., Banfield, M.J., Ermolaeva, S., Scortti, M., Goebel, W. & Vazquez-Boland, J.A. (2004) New *Listeria monocytogenes* prfA* mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol* **52**: 1553-1565.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* **8**: 52-56.
- Weber, I.T., Gilliland, G.L., Harman, J.G. & Peterkofsky, A. (1987) Crystal structure of a cyclic AMP-independent mutant of catabolite gene activator protein. *J Biol Chem* **262**: 5630-5636.
- Weber, I.T. & Steitz, T.A. (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol* **198**: 311-326.
- Weber, P.C. (1997) Overview of protein crystallization methods: Macromolecular crystallography. *Methods Enzymol* **276**: 13ff.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. & Derewenda, Z.S. (1997) Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat Struct Biol* **4**: 699-703.
- Wennerberg, K. & Der, C.J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**: 1301-1312.
- Wieggers, W., Just, I., Muller, H., Hellwig, A., Traub, P. & Aktories, K. (1991) Alteration of the cytoskeleton of mammalian cells cultured in vitro by *Clostridium botulinum* C2 toxin and C3 ADP-ribosyltransferase. *Eur J Cell Biol* **54**: 237-245.
- Wilde, C., Genth, H., Aktories, K. & Just, I. (2000) Recognition of RhoA by *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme. *J Biol Chem* **275**: 16478-16483.
- Wilde, C., Chhatwal, G.S., Schmalzing, G., Aktories, K. & Just, I. (2001) A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem* **276**: 9537-9542.
- Wilde, C., Barth, H., Sehr, P., Han, L., Schmidt, M., Just, I. & Aktories, K. (2002a) Interaction of the Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RalA. *J Biol Chem* **277**: 14771-14776.
- Wilde, C., Just, I. & Aktories, K. (2002b) Structure-function analysis of the Rho-ADP-ribosylating exoenzyme C3stau2 from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **41**: 1539-1544.
- Wilde, C., Vogelsgesang, M. & Aktories, K. (2003) Rho-specific *Bacillus cereus* ADP-ribosyltransferase C3cer cloning and characterization. *Biochemistry* **42**: 9694-9702.
- Williams, J.R., Thayyullathil, C. & Freitag, N.E. (2000) Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *J Bacteriol* **182**: 837-841.
- Wintjens, R. & Rooman, M. (1996) Structural Classification of HTH DNA-binding Domains and Protein-DNA Interaction Modes. *Journal of Molecular Biology* **262**: 294-313.
- Wittinghofer, A. & Nassar, N. (1996) How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci* **21**: 488-491.
- Wolberger, C., Dong, Y.C., Ptashne, M. & Harrison, S.C. (1988) Structure of a phage 434 Cro/DNA complex. *Nature* **335**: 789-795.
- Won, H.S., Yamazaki, T., Lee, T.W., Yoon, M.K., Park, S.H., Kyogoku, Y. & Lee, B.J. (2000) Structural understanding of the allosteric conformational change of cyclic AMP receptor protein by cyclic AMP binding. *Biochemistry* **39**: 13953-13962.
- Wu, J., Brown, S., Xuong, N.H. & Taylor, S.S. (2004) RIalpha subunit of PKA: a cAMP-free structure reveals a hydrophobic capping mechanism for docking cAMP into site B. *Structure* **12**: 1057-1065.
- Yamada, Y., Sugai, M., Woo, M., Nishida, N. & Sugimoto, T. (2001) Acquired subglottic stenosis caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* that produce

- epidermal cell differentiation inhibitor. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **84**: F38-39.
- Yamaguchi, T., Hayashi, T., Takami, H., Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Asakawa, K., Ohara, M., Komatsuzawa, H. & Sugai, M. (2001) Complete nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-ribosyltransferase, EDIN-C. *Infect Immun* **69**: 7760-7771.
- Yamamoto, M., Marui, N., Sakai, T., Morii, N., Kozaki, S., Ikai, K., Imamura, S. & Narumiya, S. (1993) ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* **8**: 1449-1455.
- Youn, H., Thorsteinsson, M.V., Conrad, M., Kerby, R.L. & Roberts, G.P. (2005) Dual roles of an E-helix residue, Glu167, in the transcriptional activator function of CooA. *J Bacteriol* **187**: 2573-2581.

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Dirk Heinz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, den hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie der Bereitstellung der beiden höchst interessanten Themen dieser Arbeit, die aufgrund ihrer Brisanz einige Male zum Aufstöhnen geführt haben, recht herzlich bedanken. Sein großes Interesse und die stete Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Dieter Jahn möchte ich mich herzlich bedanken für die Begutachtung dieser Arbeit sowie für die inspirierenden Diskussionen während der Mittwochsseminare.

Herrn Prof. Dr. Ralf Mendel danke ich für die Teilnahme an der Prüfungskommission.

Nicht genug würdigen kann ich Dr. Wolf-Dieter Schubert für seine zahlreichen Hilfestellungen bei den Strukturlösungen, den wertvollen Tipps im Umgang mit dem Computer, sein „besonderes“ Auge für schöne Farben sowie sein großes Interesse an meiner Arbeit. Falls ich mal wieder das Licht am Auto anlasse, komme ich außerdem gerne auf Deine zu jeder Tageszeit bereitgestellte Starthilfe zurück!

Dr. Manfred Nimtz und seinem Team danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen sowie Rita Getzlaff für die N-terminalen Sequenzierungen.

Bei Prof. Dr. Ingo Just bedanke ich mich für die gute Kooperation und besonderer Dank gilt Dr. Fred Hofmann, der mir immer genügend Protein zur Verfügung stellte.

Prof. Dr. Trinad Chakraborty danke ich für die Bereitstellung des Plasmides pGEX-6P1-PrfA.

Prof. Dr. Jürgen Bode und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe RDIF, besonders natürlich Martin Klar, danke ich für die freundliche Hilfestellung bei den EMSA-Experimenten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sonja Berensmeier, Gregor Hagelüken, Wolf-Dieter Schubert und Jörg Schulze für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich glaub, ich habe euch einige Stirnfalten gekostet.

Für das hervorragende Arbeitsklima, den bereitwilligen Hilfestellungen im Labor, den nicht-wissenschaftlichen Unterhaltungen beim Kuchen- und Pizzaessen und den regen Diskussionen im Büro möchte ich mich ganz besonders bei meinen Kollegen der Strukturbioogie-Abteilung bedanken, darunter Isa Astner, Maike Bublitz, Carina Büttner, Guido Dieterich, Davide Ferraris, Susanne Frese, Daniela Gebauer, Gregor Hagelüken, Joop van den Heuvel, Stefan Nakazi, Hartmut Niemann, Joachim Reichelt, Wolf-Dieter Schubert, Jörg Schulze, Sabine Weißflog, Ute Widow und Thomas Wollert. Ich hoffe, dass ihr auch ohne mich einen ansehnlichen Platz beim Staffel-Marathon belegt und euch jetzt besser in den Bräuchen der Emsländer auskennt. Den neuen Kollegen Katrin Bolte, Boris Grujic, Daniel Nickel, Alexis Kuetchou, Manuel Herrmann und Maike Rochon wünsche ich ebenso viel Spaß im Labor und im Büro wie ich ihn hatte.

Ein extra Dankeschön verdient Ute Widow, die mir bei Engpässen immer hilfreich zur Seite stand und Susanne Frese, die mir in allen Höhen und Tiefen nicht nur im Laboralltag zur Seite stand, sondern auch immer ein motivierendes Wort für mich hatte.

Bei meinen Eltern und meinem Bruder Bernd möchte ich mich besonders herzlich für die wertvolle Entlastung und Ablenkung außerhalb der GBF, besonders im Mai letzten Jahres bedanken. Die Gartenarbeit ist und bleibt für mich immer eine nette Abwechslung.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Sonja Berensmeier für die vielen Freuden außerhalb des Laboralltages. Danke, dass du meine Freundin bist.

Zu guter Letzt geht ein liebevolles Dankeschön an Jürgen, der bei mir immer an erster Stelle steht, obwohl er einige Wochenenden oft auf mich verzichten musste. Danke für deine Geduld, deinen Glauben an mich und dafür, dass du immer für mich da bist.